

Zmniejszenie intensywności widma EPR znacznika związanego z usieciowaną tkanką osierdziową, odpowiadającego ruchliwym grupom ϵ -aminowym lizyny, i brak takich zmian dla czystego kolagenu, może oznaczać, że proces sieciowania tkanki jest procesem bardziej złożonym, niż jest opisywane w literaturze. Kolagen tkankowy nie jest odrębną częścią całego układu, jakim jest tkanka, ale jednym z elementów wieloskładnikowego systemu. Między kolagenem, elastyną, proteoglikanami i fibroblastami występują powiązania i sprzężenia, które decydują o funkcji i kształcie całej tkanki. Uważa się, że fibroblasty determinują fizjologiczne funkcje pełnione przez worek osierdziowy. Jest prawdopodobne, że fibroblasty mogą być odpowiedzialne za stosunki jakościowe i ilościowe między poszczególnymi składnikami tkanki osierdziowej [2].

Podsumowanie

Wyniki uzyskane w tej pracy sugerują, że w czystym kolagenie, w wyniku braku oddziaływań z elastyną i fibroblastami, GA reaguje głównie z grupami ϵ -aminowymi hydroksylizyny. Natomiast w procesie sieciowania za pomocą GA bogatej w kolagen tkanki osierdziowej uczestniczą zarówno grupy ϵ -aminowe hydroksylizyny, jak i lizyny kolagenu. Prawdopodobnie jest to spowodowane obecnością innych składników w tkance.

Podziękowania

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną. Pomiary EPR prowadzono w Katedrze Biologii Molekularnej, Biochemii i Biofarmacji ŚAM, kierowanej przez Prof. Tadeusza Wilczka.

STABILNOŚĆ BIOCHEMICZNA TKANEK OSIERDZIA MODYFIKOWANYCH ALDEHYDEM GLUTAROWYM LUB MRÓWKOWYM

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, MAŁGORZATA MIŚKOWIEC*, ZBIGNIEW NAWRAT**, DOROTA DOMAL-KWIATKOWSKA***

*KATEDRA BIOFIZYKI,

ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, SOSNOWIEC

**FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, ZABRZE

***KATEDRA BIOLOGII MOLEKULARNEJ, BIOCHEMII I BIOFARMACJI, ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, SOSNOWIEC

Streszczenie

Porównywano stabilność biochemiczną tkanek osierdzia świni: natywnej i modyfikowanych za pomocą aldehydu glutarowego (GA) lub mrówkowego (FA). Analizowano profile elektroforetyczne białek uwalnianych z badanych tkanek, zarówno trawionych i nie poddawanych działaniu pankreatyny. Tkanki modyfikowane były bardziej odporne na trawienie enzymatyczne, niż tkanka natywna. Mała liczba prążków reprezentujących białka niskocząsteczkowe w ekstraktach uzyskanych z tkanek modyfikowanych świad-

Piśmiennictwo

References

- [1] Berliner L.J. Spin labeling. Theory and applications. Acad. Press, New York-San Francisco-London, 1976.
- [2] Bochenek A., Reicher M. (Red. Łasiński W.) Anatomia człowieka. Tom III. Układ naczyniowy. PZWL, Warszawa, 1993.
- [3] Cheung D.T., Perelman N., Ko E. C., Nimni M.E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. III. Reaction with collagen in tissues. *Connect. Tissue Res.* 1985, 13: 109-115.
- [4] Dul L., Cwalina B. Wpływ procesu sieciowania za pomocą aldehydu glutarowego na inkorporację znacznika spinowego do tkanki kolagenowej. XI Zjazd PTBiof., Cieszyn, Publ.: Current Topics in Biophysics. 2001, 25(1), 63.
- [5] Friess W. Collagen - biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998, 45: 113-136.
- [6] Gwoździński K., Bartosz G. Synteza i właściwości nitroksylowych znaczników spinowych oraz ich zastosowanie w badaniach błon biologicznych. *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej*, 1978, 3: 45-100.
- [7] Khor E. Method for the treatments of collagenous tissue for bioprotheses. *Biomaterials*, 1997, 18: 95-105.
- [8] Langdon S.E., Cherebecky R., Pereira C.A., Abdulla D., Lee J.M. Biaxial mechanical/structural effects of equibiaxial strain during crosslinking of bovine pericardial xenograft materials. *Biomaterials*, 1999, 20: 137-135.
- [9] Middleton D.A., Reid D.G., Watts A. The conformation of a functional spin-labeled derivative of gastric H/K-ATPase investigated by EPR spectroscopy. *Biochemistry*, 1995, 34: 7420-7429.
- [10] Rumian S., Mazurkiewicz S., Legendziewicz J., Woch W.M. Ocena zmian biofizycznych tkanki osierdziejowej po krótkotrwałym utrwaleniu w 0,62% wodnym roztworze glutaraldehydu. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 1992, 64(12): 1086-1090.
- [11] Sheu M.T., Huang J.C., Yeh G.C., Ho H.O. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials*, 2001, 22: 1713-1719.
- [12] Surewicz K.W. Metody interpretacji widm EPR znakowanych spinowo błon biologicznych. *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej*, 1978, 3: 21-44.

BIOCHEMICAL STABILITY OF PERICARDIAL TISSUES MODIFIED USING GLUTARALDEHYDE OR FORMALDEHYDE

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, MAŁGORZATA MIŚKOWIEC*, ZBIGNIEW NAWRAT**, DOROTA DOMAL-KWIATKOWSKA***

*DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC

**FOUNDATION FOR DEVELOPMENT OF CARDIAC SURGERY, ZABRZE

***DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND BIOPHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC

Abstract

Biochemical stability of pericardial tissues native and modified using glutaraldehyde (GA) and formaldehyde (FA) have been compared. The electrophoretic profiles of the proteins released from investigated tissues, both digested and untreated with pancreatin, have been studied. The modified tissues were more resistant to enzymatic digestion as compared with native one. A small number of lines representing low-molecular proteins in extracts obtained from the modified tissues point to these tissues higher stabil-

czy o większej stabilności tych tkanek spowodowanej ich silniejszym usieciowaniem. Wydłużenie czasu modyfikacji powodowało zwiększenie efektu stabilizacji tkanek.

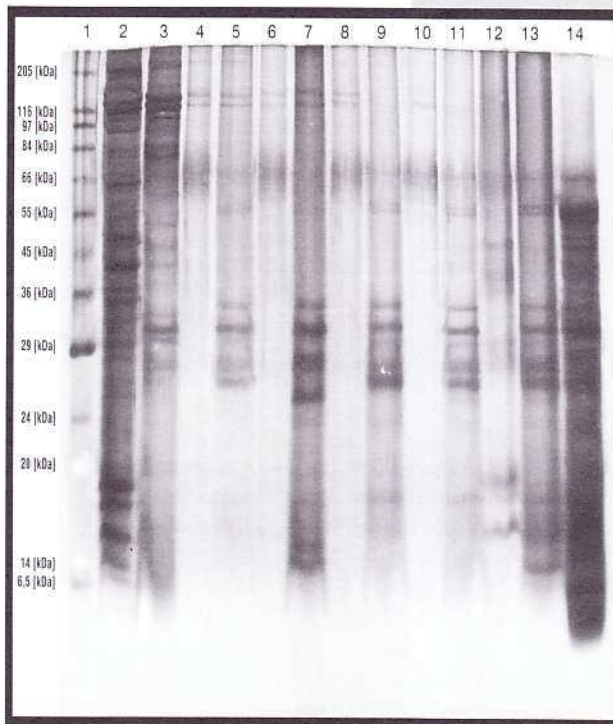
Słowa kluczowe: stabilizacja tkanek, sieciowanie, glutaraldehyd, formaldehyd, elektroforeza białek

Wprowadzenie

Modyfikacja tkanek bogatych w kolagen (w literaturze: tkanek kolagenowych) za pomocą aldehydu mrówkowego (formaldehydu; FA) lub aldehydu glutarowego (glutaraldehydu; GA) była jedną z pierwszych metod utrwalania tkanek i uzyskiwania biomateriałów tkankowych. Bioprotezy wytwarzane komercyjnie są modyfikowane za pomocą GA [4, 5].

Struktura tkanek kolagenowych może być badana m.in. z użyciem technik elektroforetycznych. Analiza elektroforegramów umożliwia jakościową i ilościową ocenę zmian zachodzących w tkance pod wpływem czynników endogennych i egzogennych, zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych [2,7]. Badania profili elektroforetycznych białek tkankowych wykorzystano np. do oceny zmian strukturalnych aorty, a także zmian zachodzących z wiekiem w zastawce mitralnej serca [3,12]. Elektroforeza została również

wykorzystana w inżynierii tkanek, do oceny wpływu procesu sieciowania na stabilizację włókien kolagenowych w bioprotetycznych zastawkach serca [7]. Analiza elektroforegramów umożliwia porównanie różnych procesów modyfikacji tkanek kolagenowych.. Jest to istotne dla optymaliza-



RYS.1. Rozdział elektroforetyczny białek ulegających ekstrakcji z tkanek osierdzia świni; ścieżki: 1 - wzorzec mas cząsteczkowych; 2 - tkanka natywna; 3 - tkanka natywna poddana trawieniu pankreatyną; 4 - tkanka modyfikowana za pomocą 0,2% GA przez 12 h; 5 - tkanka modyfikowana za pomocą 0,2% GA przez 12 h i poddana trawieniu pankreatyną; 6 - tkanka modyfikowana za pomocą 0,5% GA przez 1 h; 7 - tkanka modyfikowana za pomocą 0,5% GA przez 1 h i poddana trawieniu pankreatyną; 8 - tkanka modyfikowana za pomocą 0,5% GA przez 12 h; 9 - tkanka modyfikowana za pomocą 0,5% GA przez 12 h i poddana trawieniu pankreatyną; 10 - tkanka modyfikowana za pomocą 0,5% GA przez 24 h; 11 - tkanka modyfikowana za pomocą 0,5% GA przez 24 h i poddana trawieniu pankreatyną; 12 - tkanka modyfikowana za pomocą 4% FA przez 24 h; 13 - tkanka modyfikowana za pomocą 4% FA przez 24 h i poddana trawieniu pankreatyną; 14 - pankreatyna.

FIG. 1. Electrophoretic profiles of proteins extracted from porcine pericardium tissues; lines: 1 - standard of molecular weights; 2 - native tissue; 3 - native tissue digested with pancreatin; 4 - tissue modified with 0,2% glutaraldehyde (GA) for 12 h; 5 - tissue modified with 0,2% GA for 12 h and digested with pancreatin; 6 - tissue modified with 0,5% GA for 1 h; 7 - tissue modified with 0,5% GA for 1h and digested with pancreatin; 8 - tissue modified with 0,5% GA for 12 h; 9 - tissue modified with 0,5% GA for 12 h and digested with pancreatin; 10 - tissue modified with 0,5% GA for 24 h; 11 - tissue modified with 0,5% GA for 24 h and digested with pancreatin; 12 - tissue modified with 4% formaldehyde (FA) for 24 h; 13 - tissue modified with 4% FA for 24 h and digested with pancreatin; 14 - pancreatin.

ity due to their stronger crosslinking. Prolongation of modification time caused increase in the tissues stabilization effect.

Key words: tissue stabilization, crosslinking, glutaraldehyde, formaldehyde, protein electrophoresis

Introduction

Modification of collagen-rich tissues (in literature: collagenous tissues) using formaldehyde (FA) or glutaraldehyde (GA) was one of the first methods of tissues fixation and obtaining tissular biomaterials. Commercially developed bioprotheses are modified by means of GA [4,5].

Structure of collagenous tissues may be studied among others with use of electrophoretic techniques. Analysis of electrophoregrams makes possible qualitative and quantitative evaluation of changes occurring in tissue, influenced by endogenous or exogenous agents, both physiological and pathological [2,7]. Investigations of electrophoretic profiles of tissular proteins have been utilized for example to appreciate structural changes in aorta, as well as age-dependent changes taking place in mitral heart valve [3,12]. Electrophoresis was also used in tissue engineering to evaluate effect of cross-linking process on the collagen fibers stabilization in bioprosthetic heart valves [7]. Analysis of electrophoregrams makes possible to compare various processes of collagen tissues modification. It is important for their parameters optimization in order to obtain stable biomaterials [1,8,10].

The aim of this work was to evaluate biochemical stability of porcine pericardium tissues modified by means of GA or FA. The electrophoretic profiles of the proteins released from tissues - both native and modified, digested and untreated with pancreatin, were studied for this purpose.

Materials and methods

The material being investigated were the fibrous porcine pericardium tissues sampled directly after slaughtering of animals. Tissues were immediately rinsed in cooled (4°C) solution of phosphate-buffered saline (PBS; pH 6,5) and then placed in bottles containing this same buffer. The bottles were put in ice-cooled container used for transportation. The fibrous pericardium was mechanically separated from each pericardial sac and the fatty tissue was carefully removed.

The cleaned pericardium-tissue pieces have been cross-linked using 0,2% GA for 12 h, 0,5% GA for 1, 12 or 24 h, and also 4% FA for 24 h. Modification has been carried out at 4°C, in darkness. Then tissues have been rinsed in PBS-solution.

Biochemical stability of the native and modified tissues has been evaluated based on protein extraction assay. Determined were the molecular weights of proteins released from

Tkanka Tissue	Masa cząsteczkowa białek ekstrahowanych z tkanek osierdzia [kDa] Molecular weight of proteins extracted from pericardium tissues																								
N	207		179	154	115	94		68			48	41	37	35	30	29	27	26	23		18	16			
N-P	210		193		123		81				54	46	42			32	28								11
0,2%GA12	219			147	130			75																	
0,2%GA12P	219	202		147				75			57				35	32		27							
0,5%GA1	219		159	145				76	66																13
0,5%GA1-P				137	125			76	69	60			44	36		33	28		26	24			17		10
0,5%GA12	219						80															22			
0,5%GA12-P	219							79	63				36		33	28				25			18		
0,5%GA24	219							79															19		
0,5%GA24-P	254							76						35	32	28	27						17		
4%FA24					118			73			49	41											19		13
4%FA24-P	239							76						34	32	28	27								12
P								73			55	48	41		32	29				23					13

TABELA 1. Masa cząsteczkowa białek ekstrahowanych z tkanek osierdzia: natywnej (N); poddanej działaniu 0,2% GA w czasie 12 h (0,2% GA 12); 0,5% GA w czasie odpowiednio: 1, 12 i 24 h [(0,5% GA 1), (0,5% GA 12), (0,5% GA 24)]; 4% FA w czasie 24 h (4% FA 24); P - próbki trawione pankreatyną; barwienie srebrem.

TABLE 1. Molecular weight of proteins extracted from pericardium tissues: native (N); treated with: 0,2% GA for 12 h (0,2% GA 12); 0,5% GA for: 1, 12 or 24 h [(0,5% GA 1), (0,5% GA 12), (0,5% GA 24)]; 4% FA for 24 h (4% FA 24); P - pancreatin-digested samples; staining with silver.

cji ich parametrów w celu uzyskania stabilnych biomateriałów [1,8,10].

Celem tej pracy było porównanie stabilności biochemicznej tkanek osierdzia świni modyfikowanych za pomocą GA lub FA. Badano profile elektroforetyczne białek uwalnianych z tkanek - zarówno natywnych, jak i modyfikowanych, trawionych i nie poddawanych działaniu pankreatyny.

Materiały i metody

Materiałem poddawany badaniom były tkanki osierdzia włóknistego świni, pobierane bezpośrednio po uboju zwierząt. Tkanki były natychmiast płukane w schłodzonym (43°C) roztworze solanki buforowanej fosforanami (phosphate-buffered saline; PBS; pH 6,5) i następnie umieszczane w butelkach zawierających ten sam bufor. Butelki umieszczano w pojemniku chłodzonym lodem, wykorzystywanym do transportu. Z każdego worka osierdziowego oddzielano mechanicznie osierdzie włókniste, z którego usuwano ostrożnie tkankę tłuszczową.

Oczyszczone kawałki tkanki osierdzia modyfikowano z użyciem 0,2% roztworu GA w czasie 12h, 0,5% roztworu GA w czasie 1, 12 lub 24h, a także 4% roztworu FA w czasie 24h. Modyfikację prowadzono w temp. 4°C, w ciemności. Następnie tkanki płukano w roztworze PBS.

Stabilność biochemiczną tkanek natywnych i modyfikowanych oceniano na podstawie badania ekstrakcji białek. Oznaczano masy cząsteczkowe białek uwalnianych z tkanek oraz odporność tkanek na trawienie enzymatyczne (wodny roztwór pankreatyny, 1,5 g/100 g; 3 h).

Izolowanie białek i analizy elektroforetyczne prowadzono z zastosowaniem procedury Laemmli [6]. Białka rozdzielano z zastosowaniem metody elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) w obecności dodecylo-siarczanu sodowego (sodium dodecyl sulphate; SDS), powszechnie znanej jako metoda SDS-PAGE. Detekcję białek wewnątrz żelu prowadzono stosując metodę barwienia srebrem. Dokumentację żeli wykonywano z zastosowaniem systemu Biotec Fischer.

Wyniki

Badaniom poddano tkanki osierdzia świni: natywne i modyfikowane za pomocą glutaraldehydu (GA) lub formaldehydu (FA), w celu określenia zmian w białkach ulegających ekstrakcji z tych tkanek. Różnice między profilami elektroforetycznymi bazującymi na różnicy mas cząsteczkowych białek uwalnianych z tkanek - zarówno trawionych i nie trawionych pankreatyną - przedstawiono na RYS.1 i w TABELI 1.

tissues and their resistance to enzymatic digestion (pancreatin water solution, 1,5 g/100 g; 3h).

Isolation of the proteins and electrophoretic analyses were carried out using the Laemmli procedure [6]. The proteins have been separated using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS), commonly known as SDS-PAGE method. Protein-detection within gel has been carried out using silver-staining method. The gel-documentation has been performed using Biotec Fischer System.

Results

The porcine pericardium tissues: native and modified with glutaraldehyde (GA) or formaldehyde (FA), were studied to determine changes in the proteins extractable from them. Differences between electrophoretic profiles based on the molecular weight of the proteins released from the tissues - both digested and untreated with pancreatin - have been presented in FIG.1 and in TABLE 1.

Summary

Stability of native and modified tissues is often evaluated based on their susceptibility to enzymatic digestion. Tissue sensibility to the protease activity may be used to estimation degree of the tissue crosslinking as well as its denaturation [9,11].

In this work, qualitative analysis of electrophoretic profiles of proteins released from porcine pericardium tissues have been used for evaluation effect of their chemical modification.

It has been demonstrated that biochemical properties of tissues modified using glutaraldehyde (GA) or formaldehyde (FA) differed from properties of native tissue. Electrophoretic profiles (FIG.1) of the modified tissues indicate on their higher resistance to enzymatic digestion (pancreatin) as compared with native tissue. Extraction from modified tissues of smaller amounts of low-molecular proteins (TAB.1) points to their stronger crosslinking. It was also demonstrated that prolongation of the modification time caused increase in the stability of fixed tissues.

Acknowledgements

This work was financially supported by Medical University of Silesia.

Podsumowanie

Stabilność natywnych i modyfikowanych tkanek określana jest często na podstawie ich podatności na trawienie enzymatyczne. Wrażliwość tkanki na aktywność proteaz może być wykorzystana do oceny stopnia jej sieciowania jak również denaturacji [9,11].

W niniejszej pracy wykorzystano jakościową analizę profili elektroforetycznych białek uwalnianych z tkanek osierdzia świni do oceny efektu ich modyfikacji chemicznej.

Wykazano, że właściwości biochemiczne tkanek modyfikowanych z użyciem glutaraldehydu (GA) lub formaldehydu (FA) różniły się od właściwości tkanki natywnej. Profile elektroforetyczne (RYS.1) tkanek modyfikowanych wskazują na ich większą odporność na trawienie enzymatyczne (pankreatyna), w porównaniu z tkanką natywną. Ekstrakcja z tkanek modyfikowanych mniejszych ilości białek niskocząsteczkowych (TAB.1) świadczy o ich silniejszym sieciowaniu. Ponadto stwierdzono, że wydłużenie czasu modyfikacji powodowało wzrost stabilności utrwalań tkanek.

Podziękowanie

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną.

ZMIANY NAPRĘŻENIA W TKANCE OSIERDZIA PODCZAS JEJ MODYFIKACJI KWASEM TANINOWYM

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, MARIA JASTRZĘBSKA*, ANETA FLUDER*, PAWEŁ KOSTKA**

*KATEDRA BIOFIZYKI,
ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, SOSNOWIEC

**FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII,
ZABRZE

Streszczenie

Badano zmiany naprężenia powstające w tkance osierdzia włóknistego świni podczas jej sieciowania za pomocą kwasu taninowego (TA). Równocześnie analizowano wpływ czasu modyfikacji na właściwości wytrzymałościowe biomateriału tkankowego. Stwierdzono, że proces modyfikacji tkanki osierdzia za pomocą TA przebiegał w trzech etapach, odzwierciedlonych przez zmiany wielkości naprężeń powstających w tkance. Wyniki sugerują, że naprężenia te mogą decydować o stabilności mechanicznej biomateriałów w warunkach in vivo. Czas modyfikacji tka-

Piśmiennictwo

References

67

- [1] Cwalina B., Turek A., Sliupkas - Dyrda E., Nawrat Z. Effect of tissue - stabilization on electrophoretic profiles of proteins extracted from porcine pericardium. *Engineering of Biomaterials*. 2001; 17 - 19: 89-91.
- [2] Gianazza E., Osio L., Grazioli G., Astrua-Testori S., Righetti P.G., Accinni R., Renoldi I., Repossini A. An examination of heart proteins by two-dimension electrophoresis. *Clin. Chem*. 1987; 33: 2011-2018.
- [3] James V.J., McConnell J.F., Capel M. The d-spacing of collagen from mitral valve changes with ageing, but not with collagen type III content. *Biochim. Biophys. Acta*, 1991; 1078: 19-22.
- [4] Jayakrishnan A., Jameela S.R. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices. *Biomaterials*. 1996; 17: 471-484.
- [5] Khor E. Methods of the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Biomaterials*. 1997; 18: 95-105.
- [6] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 227: 680-685.
- [7] Moczar M., Leceref L., Ginat M., Loisan D. Complement Activation Is Involved in the Structural Deterioration of Bovine Pericardial Bioprosthetic Heart Valves. *Asaio Journal*. 1996; 42: M 375 - M381.
- [8] Moore M.A., Bohachevsky I.K., Cheung D.T., Boyan B.D., Chen W-M, Bickers R.R., McLroy B.K. Stabilization of pericardial tissue by dye-mediated photooxidation. *J. Biomed. Mater. Res*. 1994; 28: 611-618.
- [9] Moore M.A., Philips R.E. Biocompatibility and immunogenic properties of pericardial tissue stabilized by dye-mediated photooxidation. *J. Heart. Valve. Dis*. 1997; 6: 307-315.
- [10] Shen M., Carpentier S.M., Cambillau M., Chen L., Martinet B., Carpentier A. Protein adsorption in glutaraldehyde-preserved bovine pericardium and porcine valve tissue. *Ann. Thorac. Surg*. 2001; 71(5 Suppl): 408-409.
- [11] Weadock K.S., Miller E.J., Keuffel E.L., Dunn M.G. Effect of physical crosslinking methods on collagen-fiber durability in proteolytic solutions. *J. Biomed. Mater. Res*. 1996; 32: 221-226.
- [12] Xu Ch., Lee S., Singh T.M., Sho E., Li X., Sho M., Masuda H., Zarins Ch. Molecular mechanisms of aortic wall remodeling in response to hypertension. *J. Vasc. Surg*. 2001; 33: 570-578.

STRESS CHANGES IN PERICARDIUM TISSUE DURING ITS MODIFICATION WITH TANNIC ACID

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, MARIA JASTRZĘBSKA*, ANETA FLUDER*, PAWEŁ KOSTKA**

*DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC

**FOUNDATION FOR DEVELOPMENT OF CARDIAC SURGERY,
ZABRZE

Abstract

Stress changes arising in fibrous pericardium tissue during its crosslinking by means of tannic acid (TA) have been investigated. The influence of modification time on mechanical properties of tissular biomaterial has been analyzed simultaneously. It has been found that the process of the pericardium tissue modification with TA took place in three stages, reflected by changes in quantity of stresses originated in tissue. The results suggest that these stresses may determine mechanical stability of biomaterials under in vivo conditions. Obtaining the biomaterial possess-