

# The Study on Biocompatibility of BVLD-Functionalized Coating with Controlled NO Catalytic Release

Shuai Liu, Junqiu Xia, Feng Zhang, Xin Tan, Qiufen Tu\*

Key Laboratory of Advanced Technologies of Materials, School of Materials Science and Engineering, Southwest Jiaotong University, Chengdu Sichuan  
Email: \*tuqiufen@swjtu.edu.cn

Received: May 7<sup>th</sup>, 2018; accepted: May 22<sup>nd</sup>, 2018; published: May 30<sup>th</sup>, 2018

---

## Abstract

In this study, tannic acid (TA) was immobile on the polyallylamine film (PPAam) applied on 316L stainless steel via plasma polymerization in alkaline aqueous solution to provide rich active sites followed by covalently grafting bivalirudin (BVLD) and selenocystamine (SeCA) through Michael addition reaction and Schiff base reaction, thereby constructing a multifunctional bionic coating which can exhibit anticoagulant and antiproliferative properties and additionally promote the regeneration of healthy endothelium. Anticoagulant properties were demonstrated by activated partial thromboplastin time (APTT). Additionally, cell proliferation assays were carried out to test influence of the coating on the endothelial cells (ECs) and smooth muscle cells (SMCs). The result showed that the constructed coating not only promoted the growth of endothelial cells, but simultaneously inhibited the proliferation of smooth muscle cells. Furthermore, the coating dramatically prolonged clotting time compared with the control without BVLD grafted thereon.

## Keywords

Tannic Acid, Nitric Oxide, Bivalirudin, Plasma Polymerization

---

# 具有一氧化氮可控催化释放的比伐卢定功能化涂层的生物相容性研究

刘 帅, 夏俊秋, 张 峰, 谭 星, 涂秋芬\*

西南交通大学材料先进技术教育部重点实验室, 材料科学与工程学院, 四川 成都  
Email: \*tuqiufen@swjtu.edu.cn

---

\*通讯作者。

文章引用: 刘帅, 夏俊秋, 张峰, 谭星, 涂秋芬. 具有一氧化氮可控催化释放的比伐卢定功能化涂层的生物相容性研究[J]. 材料科学, 2018, 8(5): 625-634. DOI: 10.12677/ms.2018.85074

## 摘要

本研究采用等离子体聚合技术在316L SS表面沉积聚烯丙胺薄膜, 在碱性条件下进一步固定单宁酸(TA), 为表面提供大量活性位点, 进而通过迈克加成席夫碱反应共价接枝比伐卢定(BVLD)和硒代胱胺(SeCA), 构建促内皮、抗凝和抗增生的多功能仿生涂层。采用活化部分凝血活酶时间(APTT)评价其抗凝性能, 并进行细胞增殖实验(CCK-8)评价涂层对内皮细胞和平滑肌细胞的影响。结果显示, 构建的仿生涂层在促进内皮细胞生长的同时显著抑制了平滑肌的生长, 此外, 与未接枝BVLD的对照涂层相比, 该仿生涂层还显著延长了凝血时间。

## 关键词

单宁酸, 一氧化氮, 比伐卢定, 等离子体聚合技术

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

临床血管支架的植入常常伴随着内皮细胞的损伤, 从而导致植入部位急性凝血以及平滑肌细胞表型的失调。BVLD 是一种特异性可逆的凝血酶抑制剂[1]。其可与凝血酶结合而使其失活, 从而实现抗凝血的功能。然而, 只抑制凝血酶的活性并不能取得良好的抗凝血效果, 因此本研究还采用 NO 抑制血小板的粘附、激活来与 BVLD 协同地发挥作用。NO 作为内皮细胞的生物活性分子, 不仅能通过 CGMP 信号通路抑制血小板的粘附和激活, 而且能够抑制平滑肌的粘附和增殖[2] [3] [4]; 此外, NO 还具有免疫响应、抗癌和抗菌的作用[5] [6] [7]。由于人体内的内源性 RSNO 水平恒定, 在涂层表面引入的催化剂可以持续稳定的产生 NO [8]。本研究选取 SeCA 作为 NO 的催化剂。由于 PPAam 表面的-NH<sub>2</sub>量有限, 所以通过在 PPAam 表面接枝 TA 来提供大量的活性位点, 从而固定大量的 BVLD 和 SeCA, 构建 PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验试剂

烯丙胺、比伐卢定(BVLD)、单宁酸(TA)、N-二羟乙基甘氨酸(Bicine)缓冲液、磷酸盐(PBS)缓冲液、NaOH 溶液、罗丹明染色试剂、活化部分凝血活酶时间(APTT)购自 Sigma 公司、CCK-8 试剂购自同仁化学研究所。

### 2.2. 各类涂层的制备

采用实验室自制脉冲射频可调制波等离子体聚合系统在 316L SS 样品表面沉积等离子体聚烯丙胺薄膜(PPAam)。采用-250 V 的直流偏压源, 氩气(Ar)做保护气体。将沉积 PPAam 的样品浸没在 TA 溶液(0.2 mg/mL, pH = 9)中室温下反应 12 小时后, 清洗、干燥获得 PPAam@TA 样品。将制备的 PPAam@TA 样品

浸没在 BVLD 溶液(0.2 mg/mL, pH = 9)中常温下反应 12 h, 清洗、干燥获得 PPAam@TA@BVLD 样品。而将制备的 PPAam@TA 浸没在 SeCA 溶液(0.2 mg/mL, pH = 9)中常温下反应 12 h, 清洗干燥后获得 PPAam@TA@SeCA 样品。将制备的 PPAam@TA 样品浸没在 BVLD 溶液中常温下反应 40min, 清洗后加入 SeCA 溶液, 室温下反应 8 h, 清洗、干燥获得 PPAam@TA@BVLD + SeCA 多功能分子涂层。

制备各涂层的工艺如图 1 所示, 通过 QCM 技术精确调控 BVLD 和 SeCA 的接枝量为 1:1, 通过对比 PPAam@TA@BVLD + SeCA、PPAam@TA@SeCA 和 PPAam@TA@BVLD 涂层的材料学结果, 验证 PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层是否以 1:1 的比例接枝, 并对比 PPAam@TA@BVLD + SeCA、PPAam@TA@SeCA 和 PPAam@TA@BVLD 涂层的生物学结果, 评价 PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层中 BVLD 和 TA 是否协同地发挥了作用。

## 2.3. 材料学表征

### 2.3.1. QCM 实时动态检测活性分子接枝量

将 PPAam@TA 涂层改性的石英晶片安装到 QCM-D 流动腔内, 通入 PBS 缓冲液, 待基线跑平 20 min 后通入 0.2 mg/mL BVLD 溶液, 接枝量达到饱和后通入 PBS 缓冲液进行清洗。SeCA 的接枝定量, 以及 BVLD + SeCA 的双分子的接枝定量方法相同。

### 2.3.2. 其它材料学评价

采用傅立叶变换红外光谱法(FTIR, NICOLET 5700)检测上述各涂层表面的红外吸收峰。检测模式为漫反射, 测量范围设定为  $4000\sim 500\text{ cm}^{-1}$ 。X 射线光电子谱(XPS, XSAM800)对上述各涂层表面成分进行检测, 分析各个涂层中 C、O、N、Se 的原子含量百分比。

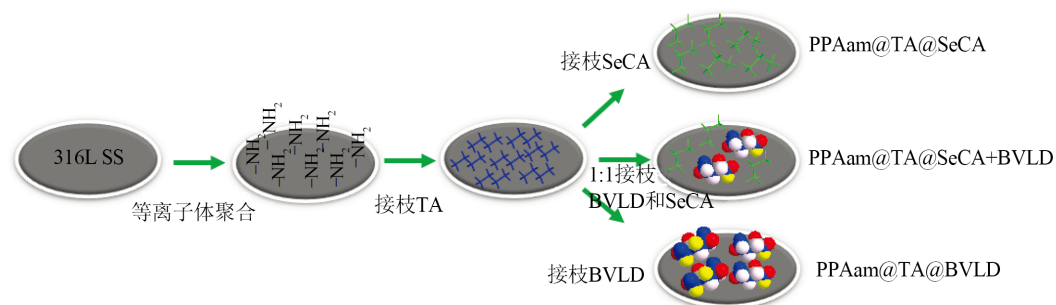
## 2.4. NO 催化速率检测

采用 NO 测定仪(Sievers NOA 280i)进行 NO 催化速率的测定。向反应槽中加入 5 mL 的 PBS 溶液(含  $0.5\text{ }\mu\text{mol/ml}$  的 EDTA、 $30\text{ }\mu\text{mol/mL}$  的 GSH 和 SNAP), 待基线跑平后, 将 PPAam@TA@SeCA、PPAam@TA@BVLD + SeCA 不锈钢片插入反应槽中, 待曲线不再有明显变化终止实验, 记录 NO 催化释放速率。

## 2.5. 生物学评价

### 2.5.1. APTT

将 0.2 mL APTT 溶液滴加到样品表面, 使其完全覆盖或者浸没,  $37^{\circ}\text{C}$  孵化半小时, 吸出样品上的 APTT



**Figure 1.** The schematic diagram of preparation of PPAam, PPAam@TA, PPAam@TA@BVLD, PPAam@TA@SeCA, PPAam@TA@BVLD + SeCA coatings

**图 1.** PPAam, PPAam@TA, PPAam@TA@BVLD, PPAam@TA@SeCA, PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层制备的示意图

试剂, 加入 0.2 mL 待测的血浆, 观测凝血现象, 当出现白色絮状物时记录其凝血时间。取 0.2 mL 待测血浆加入 0.2 mL 的 APTT 试剂作为空白对照。

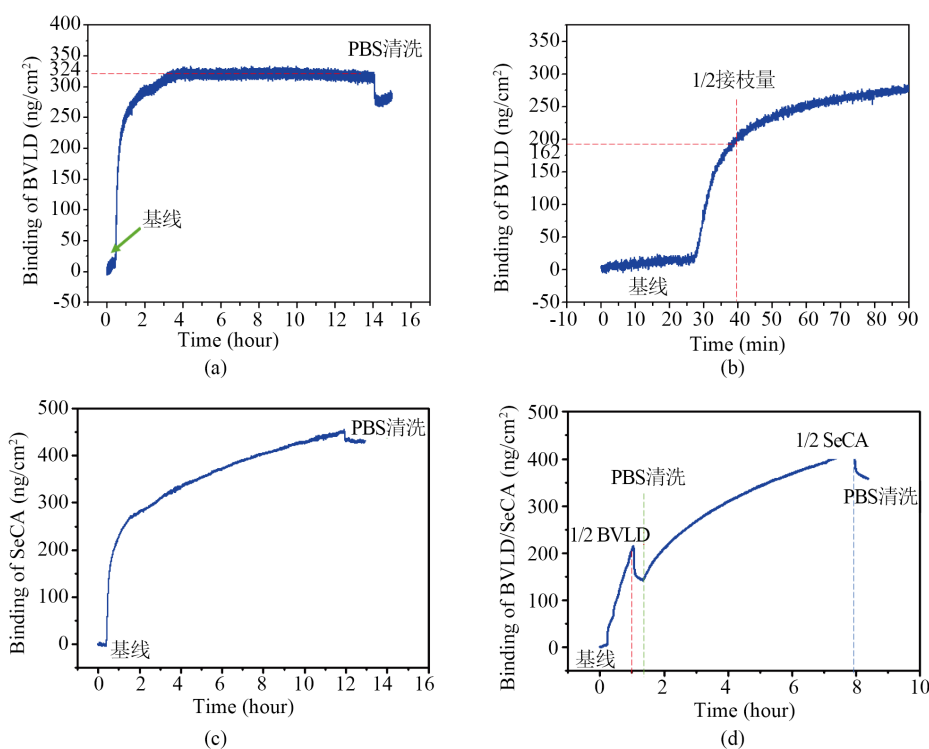
### 2.5.2. 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)及人脐静脉平滑肌细胞(HUASMCs)增殖

样品表面分别接种密度为  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> 的 HUVECs 和 HUASMCs; 分别培养 1 天和 3 天后吸出培养基, PBS 清洗两次后加入 350  $\mu$ L 含有 10% CCK-8 试剂的完全培养基(无酚红), 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下孵育 3 小时。孵育结束后, 每孔吸取 200  $\mu$ L 反应液到 96 孔板, 置于酶标仪( $\mu$ Quant)中检测溶液在 450 nm 处的吸光度值(n = 4)。

## 3. 结果和讨论

### 3.1. QCM 实时动态检测活性分子接枝量

图 2(a)为 PPAam@TA 表面 BVLD 的实时接枝量, 结果显示 324 ng/cm<sup>2</sup> 的 BVLD 有效固定在 PPAam@TA 表面; 从其局部放大图(b)中可看出, 接枝饱和量的 1/2 的时间点为 40 min, 该时间点作为 BVLD + SeCA 共固定时间设定的依据; 图 2(c)是 QCM-D 实时动态监测技术检测 SeCA 在 PPAam@TA 表面接枝量的动态曲线, 结果显示约 450 ng/cm<sup>2</sup> 的 SeCA 固定在 PPAam@TA 表面; 图 2(d)为 PPAam@TA 表面 BVLD 和 SeCA 共固定的动态曲线, 如图所示, 通入 BVLD 溶液反应 40 min 后时, 接枝量达到 200 ng/cm<sup>2</sup> 左右, 通入 PBS 缓冲液清洗待洗。清洗结束后通入 SeCA 溶液反应 6h。最终结果显示 BVLD 的有效结合量为 163 ng/cm<sup>2</sup> 而 SeCA 的结合量为 176 ng/cm<sup>2</sup>, PPAam@TA 表面 BVLD 和 SeCA 的有效结合量基本满足 1:1 的比例。



**Figure 2.** (a) Chemical conjugation of BVLD; (c) SeCA; (d) BVLD + SeCA onto the PPAam@TA surface monitored by real-time QCM-D; (b) enlarged image of figure (a)

**图 2.** (a)通过 QCM-D 技术监测 BVLD; (c) SeCA; (d) BVLD + SeCA 在 PPAam 表面的实时接枝曲线图; (b):(a)的局部放大图

### 3.2. 涂层的 FTIR 及 XPS 结果

图 3 是 PPAam、PPAam@TA 和 PPAam@TA@BVLD 涂层的红外光谱图, 从图中可以看出, PPAam 涂层在  $3350\text{ cm}^{-1}$  出现了 N-H 的伸缩振动峰以及在  $1650\text{ cm}^{-1}$  出现了 N-H 的变型振动峰; 接枝 TA 后, PPAam@TA 的红外光谱中在  $1580$  和  $1500\text{ cm}^{-1}$  出现了苯环的特征峰, 可以证实 PPAam 表面上成功接枝了 TA; 进一步接枝 BVLD 后, PPAam@TA@BVLD 涂层中出现了酰胺键( $\text{O}=\text{C}-\text{NH}-$ )的吸收峰, 强有力的证明了 BVLD 的有效固定。

图 4(a)是 PPAam、PPAam@TA、PPAam@TA@SeCA、PPAam@TA@BVLD、PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层的 XPS 全谱图, 表 1 为各涂层的元素百分含量。PPAam 涂层的全谱中出现了 C、N、O 的特征峰, 证明了 PPAam 涂层在基底上的沉积; 进一步接枝 TA 后, 由于 TA 中不含有 N 元素, 使得 PPAam@TA 涂层中 N 元素含量的明显下降; 由于 BVLD 中的 O 含量明显高于 PPAam@TA 涂层的 O 含量, 使得 PPAam@TA@BVLD 涂层中测得的 O 原子含量高于 PPAam@TA, 可进一步说明 BVLD 的成功固定; PPAam@TA@SeCA 涂层的谱线中出现了 Se 的特征峰, 有力的证实了 SeCA 在涂层表面的接枝; PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层的谱线中同样存在 Se 的特征峰, 由于 SeCA 中 O 含量为 19.1%, BVLD 中 O 含量为 24.24%, 而 PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层中 O 含量介于 PPAam@TA@SeCA 和 PPAam@TA@BVLD 涂层的 O 含量之间, 可间接的说明 PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层的成功制备。

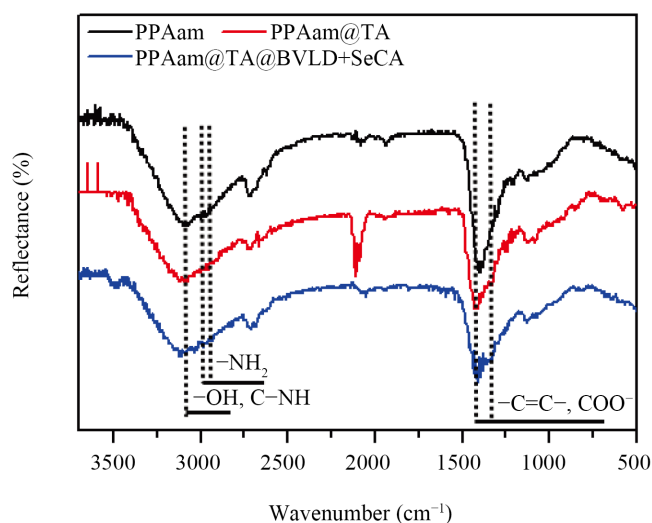


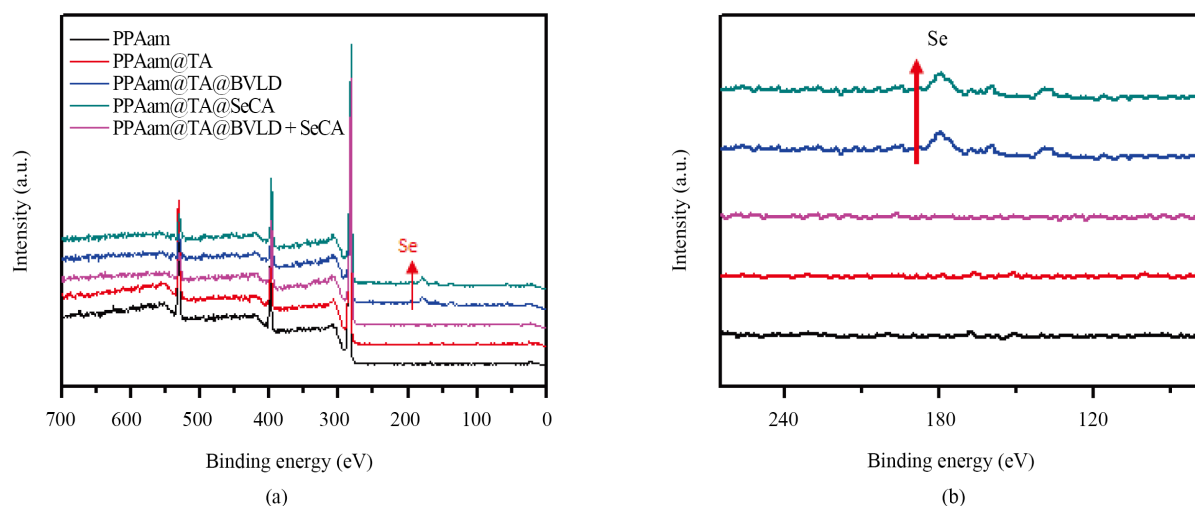
Figure 3. GATR-FTIR spectra of PPAam, PPAam@TA and PPAam@TA@BVLD

图 3. PPAam、PPAam@TA 和 PPAam@TA@BVLD 的红外光谱

Table 1. Atomic composition of samples obtained using XPS

表 1. 通过 XPS 得到的各样品的原子组成

Sample	C (%)	N (%)	O (%)	Se (%)
PPAam	71.04	15.49	13.48	/
PPAam@TA	74.53	11.68	13.79	/
PPAam@TA@BVLD	75.71	9.74	14.55	/
PPAam@TA@SeCA	74.87	11.2	12.1	1.83
PPAam@TA@BVLD + SeCA	74.42	11.64	12.39	1.55



**Figure 4.** (a) XPS spectra of PPAam, PPAam@TA, PPAam@TA@SeCA, PPAam@TA@BVLD and PPAam@TA@BVLD + SeCA; (b) enlarged image of figure (a)

**图 4.** (a) PPAam、PPAam@TA、PPAam@TA@SeCA、PPAam@TA@BVLD 和 PPAam@TA@BVLD + SeCA 的 XPS 的全谱图(b)局部放大图; (b):(a)的局部放大图

### 3.3. NO 催化速率结果

图 5 是 PPAam@TA@SeCA 和 PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层的 NO 催化释放速率曲线，可以看出，PPAam@TA@SeCA 涂层稳定后的催化速率为  $0.8 \times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ 。PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层的催化速率为  $0.45 \times 10^{-10} \text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ 。该催化释放速率也间接说明 PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层中 SeCA 的接枝量为 PPAam@TA@SeCA 涂层的 1/2。

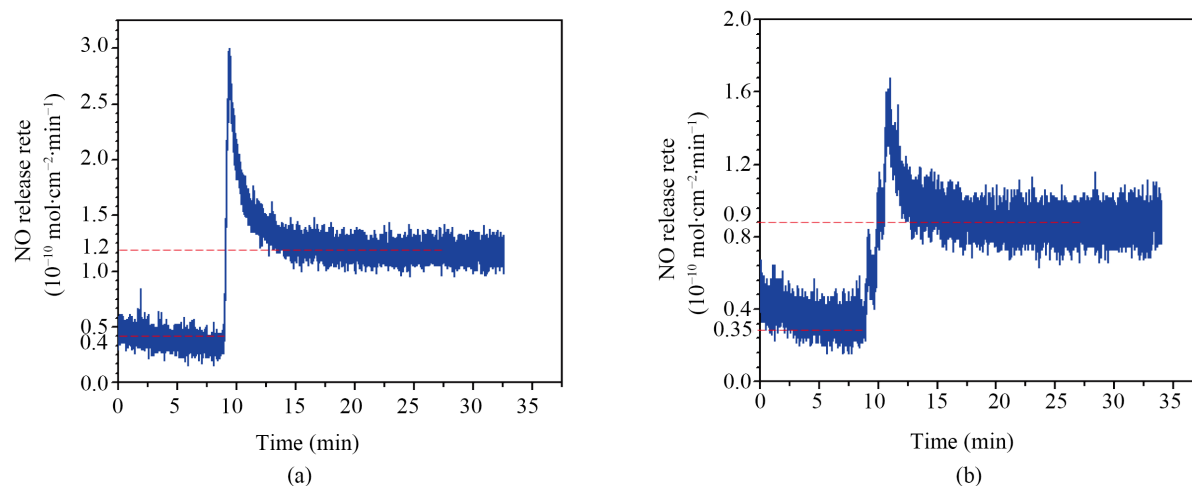
### 3.4. APTT

图 6 是各组样品的凝血时间，结果显示，316L SS、PPAam、PPAam@TA、PPAam@TA@SeCA 涂层没有抗凝活性分子，凝血时间均在 35~45 s 之间，不存在显著性差异；而对 PPAam@TA@BVLD 涂层的 APTT 试剂实验显示抗凝时间在 65 s 以上，与不含 BVLD 活性分子的其他对照组相比，抗凝血效果明显增强；PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层与不含 BVLD 活性分子的其他对照组相比，也表现出明显的抗凝效果。1/2 接枝量的 BVLD 涂层抗凝效果比完全接枝 BVLD 涂层抗凝效果略有下降，是由于 SeCA 占据了涂层一部分接枝的活性位点，造成 BVLD 的接枝量有所减少，导致凝血时间的下降。

### 3.5. HUVECs 及 HUVMCs 增殖

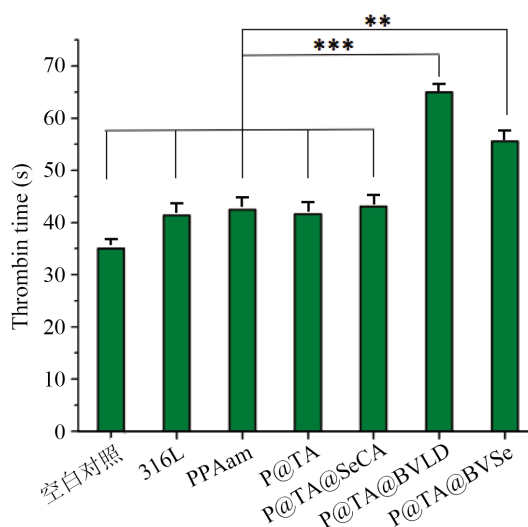
图 7 是各组样品表面内皮细胞 1 天和 3 天的形态结果。1 天的结果显示，316L SS 表面内皮细胞数量较少，而接枝 PPAam 后，所引入的  $\text{-NH}_2$  对内皮增殖有促进作用，使得内皮细胞数量有一定的上升；PPAam@TA 和 PPAam@TA@SeCA 上内皮细胞的数量与 PPAam 相比，无明显差异；而 PPAam@TA@BVLD 上的内皮细胞数量有了明显的上升，说明 BVLD 对内皮细胞的增殖有一定的促进作用；PPAam@TA@BVLD + SeCA 上的内皮细胞虽不及 PPAam@TA@BVLD 的多，但相比于其他涂层，数量上仍有较为明显的增加。当培养基中添加了 NO 供体后，供体组中 PPAam@TA@SeCA 和 PPAam@TA@BVLD + SeCA 相比于非供体组，内皮细胞数量的增加十分明显，说明了 NO 对内皮细胞的增殖起到了促进的作用。这与图(b)中使用 CCK-8 定量检测内皮细胞增殖的结果一致，均说明了构建的 PPAam@TA@BVLD + SeCA 表现出良好的促内皮功能。





**Figure 5.** (a) Release of NO catalyzed by PPAam@TA@SeCA and (b) PPAam@TA@BVLD + SeCA coating after continuous exposure to the NO donor solution

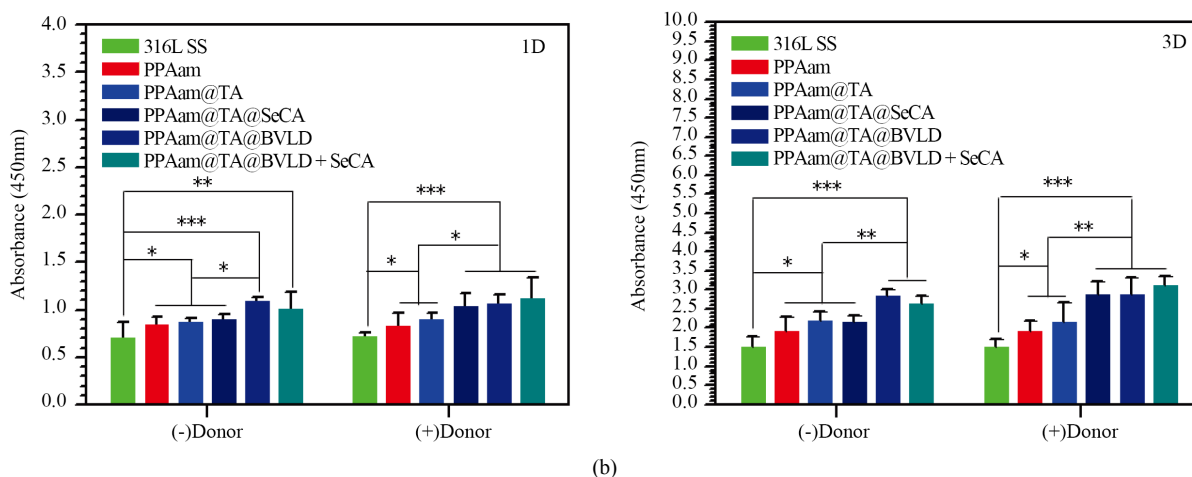
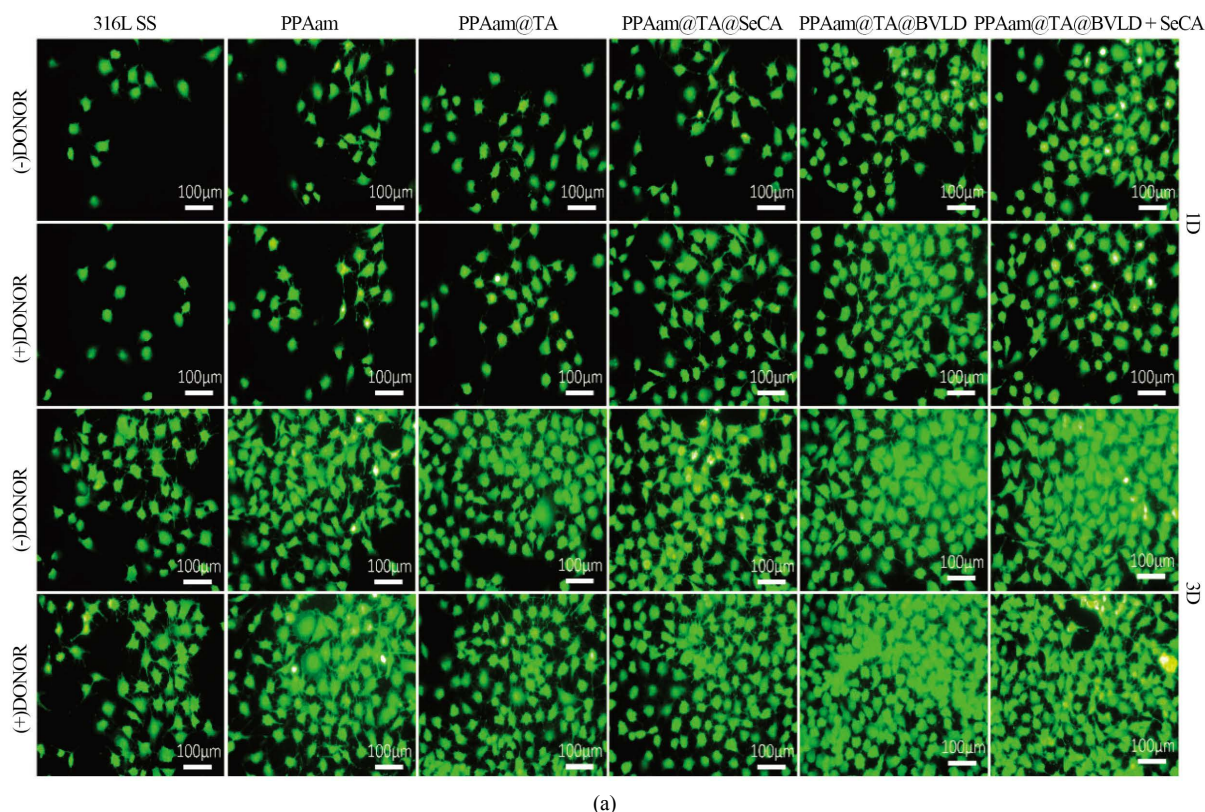
**图 5.** (a) PPAam@TA@SeCA 涂层的 NO 催化释放速率; (b) PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层的 NO 催化释放速率



**Figure 6.** Clotting time of 316L SS, PPAam, PPAam@TA, PPAam@TA@SeCA, PPAam@TA@BVLD and PPAam@TA@BVLD + SeCA

**图 6.** 316L SS, PPAam, PPAam@TA, PPAam@TA@SeCA, PPAam@TA@BVLD 和 PPAam@TA@BVLD + SeCA 的凝血时间

图 8 是 316L SS、PPAam、PPAam@TA、PPAam@TA@SeCA、PPAam@TA@BVLD 和 PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层表面平滑肌细胞的 1 天和 3 天的荧光图及增殖的结果。如图 8(a) 中 1 天的结果显示，非供体组中 316L SS、PPAam、PPAam@TA、PPAam@TA@SeCA、PPAam@TA@BVLD 和 PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层表面的细胞数量基本相差不大，无显著性差异，且细胞呈长梭形，铺展状态良好。而供体组中 PPAam@TA@SeCA、PPAam@TA@BVLD + SeCA 涂层上平滑肌细胞的数量与非供体组相比明显减少，表明了 NO 对平滑肌细胞增殖的抑制作用，且由于 PPAam@TA@BVLD + SeCA 催化释放 NO 的速率低于 PPAam@TA@SeCA，对平滑肌细胞的抑制作用也没有 PPAam@TA@SeCA 强。3 天的结果与 1 天的结果基本一致，更加明显的表现出 NO 能抑制平滑肌细胞的增生。这与图(b)中使用 CCK-8 定量检测内皮细胞增殖的结果一致，均说明了构建的 PPAam@TA@BVLD + SeCA 表现出抑制平滑肌生长的功能。



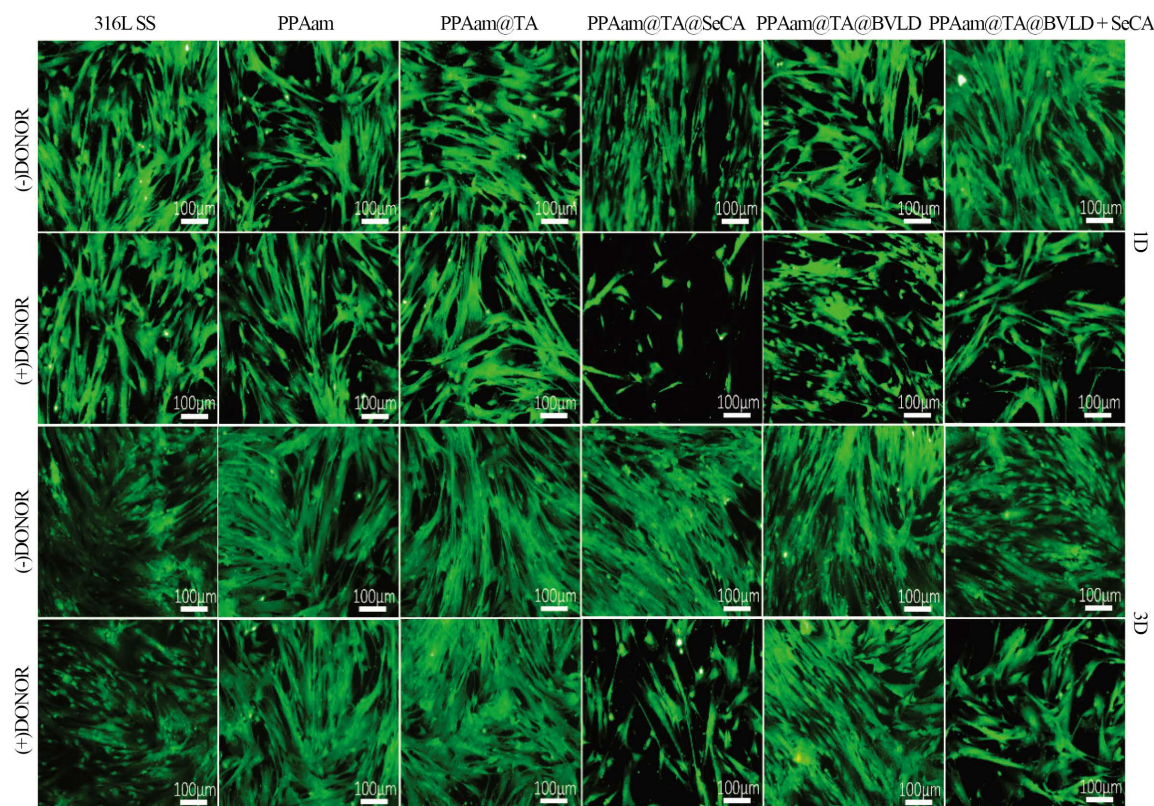
**Figure 7.** Adhesion and proliferation of HUVECs cultured on the 316L SS, PPAam, PPAam@TA, PPAam@TA@SeCA, PPAam@TA@BVLD and PPAam@TA@BVLD + SeCA for 1 and 3 days, (a) Fluorescent graphs and (b) CCK-8 Value

**图 7.** HUVECs 在 316L SS、PPAam、PPAam@TA、PPAam@TA@SeCA、PPAam@TA@BVLD 和 PPAam@TA@BVLD + SeCA 表面的粘附与增殖。(a) 免疫荧光图片, (b) CCK-8 检测结果

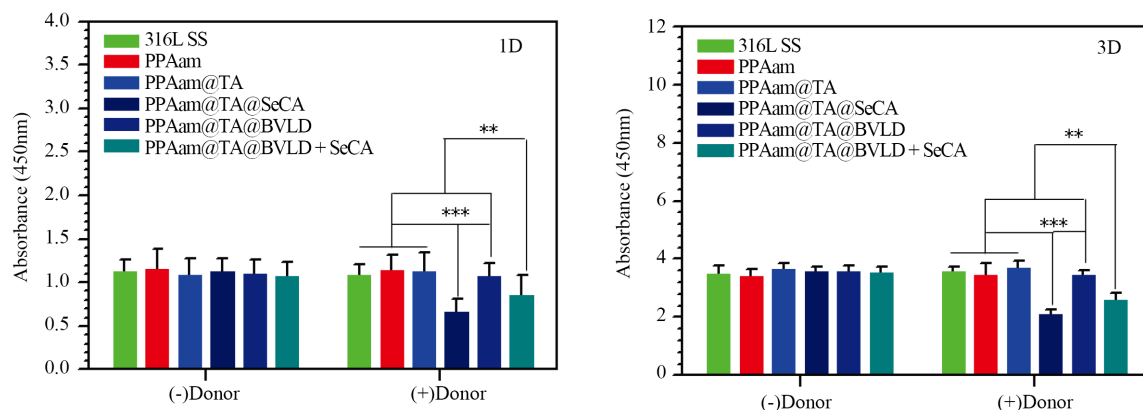
#### 4. 结论

通过等离子体聚合技术在基材表面打底, 进一步接枝 TA, 为表面提供大量活性位点, 再通过迈克加成席夫碱反应实现比伐卢定和硒代胱胺的共固定。红外光谱(FT-IR)和 X 射线光电子能谱(XPS)的结果表明了涂层的成功制备。通过耗散型石英晶体微天平(QCM-D)确定了比伐卢定和硒代胱胺的接枝量, 且通过 NO 动态实时催化速率检测, 测得涂层的 NO 催化释放速率。活化部分凝血活酶时间(APTT)实验结果





(a)



(b)

**Figure 8.** Adhesion and proliferation of HUASMCs cultured on the 316L SS, PPAam, PPAam@TA, PPAam@TA@SeCA, PPAam@TA@BVLD and PPAam@TA@BVLD + SeCA for 1 and 3 days, (a) Fluorescent graphs and (b) CCK-8 Value

**图 8.** HUASMCs 在 316L SS、PPAam、PPAam@TA、PPAam@TA@SeCA、PPAam@TA@BVLD 和 PPAam@TA@BVLD+SeCA 表面的粘附与增殖。(a) 免疫荧光图片, (b) CCK-8 检测结果

显示, 接枝了 BVLD 的涂层明显地延长了凝血时间。内皮细胞和平滑肌细胞增殖的结果显示, 构建的仿生涂层在促进内皮细胞生长的同时显著抑制了平滑肌细胞的生长。

## 参考文献

- [1] Sinnaeve, P.R., Simes, J., Yusuf, S., *et al.* (2005) Direct Thrombin Inhibitors in Acute Coronary Syndromes: Effect in

Patients Undergoing Early Percutaneous Coronary Intervention. *European Heart Journal*, **26**, 2396-2403.

<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehi590>

- [2] Major, T.C., Brant, D.O., Reynolds, M.M., *et al.* (2010) The Attenuation of Platelet and Monocyte Activation in a Rabbit Model of Extracorporeal Circulation by a Nitric Oxide Releasing Polymer. *Biomaterials*, **31**, 2736-2745. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.12.028>
- [3] Kushwaha, M., Anderson, J.M., Bosworth, C.A., *et al.* (2010) A Nitric Oxide Releasing, Self Assembled Peptide Amphiphile Matrix That Mimics Native Endothelium for Coating Implantable Cardiovascular Devices. *Biomaterials*, **31**, 1502-1508. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.10.051>
- [4] Naghavi, N., Mel, A.D., Alavijeh, O.S., *et al.* (2013) Nitric Oxide Donors for Cardiovascular Implant Applications. *Small*, **9**, 22-35. <https://doi.org/10.1002/sml.201200458>
- [5] Moncada, S. (1999) Nitric Oxide: Discovery and Impact on Clinical Medicine. *Journal of the Royal Society of Medicine*, **92**, 164. <https://doi.org/10.1177/014107689909200402>
- [6] Mocellin, S., Bronte, V. and Nitti, D. (2007) Nitric Oxide, a Double Edged Sword in Cancer Biology: Searching for Therapeutic Opportunities. *Medicinal Research Reviews*, **27**, 317-352. <https://doi.org/10.1002/med.20092>
- [7] Cai, W., Wu, J., Xi, C., *et al.* (2012) Diazeniumdiolate-Doped Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid)-Based Nitric Oxide Releasing Films as Antibiofilm Coatings. *Biomaterials*, **33**, 7933-7944. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.07.027>
- [8] Jun, Y., Welby, J.L. and Meyerhoff, M.E. (2008) Generic Nitric Oxide (NO) Generating Surface by Immobilizing Organoselenium Species via Layer-by-Layer Assembly. *Langmuir*, **24**, 10265-10272. <https://doi.org/10.1021/la801466e>

**知网检索的两种方式:**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2160-7613, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [ms@hanspub.org](mailto:ms@hanspub.org)