

DOI: 10.15825/1995-1191-2017-3-53-64

СШИВАЕМЫЕ *IN SITU* ГИДРОГЕЛИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

Кун Мин Парк¹, Ки Донг Парк², В.И. Севастьянов³, Е.А. Немец³, В.Н. Василец³

¹ Отделение биоинженерии, Колледж наук о жизни и биоинженерии, Национальный университет Инчона, Инчон, 22012, Республика Корея

² Факультет молекулярной науки и технологии, Университет Ажон, Сувон 443-749, Республика Корея

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Формируемые (сшиваемые) *in situ* гидрогели широко применяются в качестве терапевтических имплантатов и систем доставки для различных биомедицинских технологий, включая тканевую инженерию, регенеративную медицину и фармакологию, благодаря биосовместимости гидрогелей и простоте инкорпорирования в них лекарственных веществ, клеток или сигнальных молекул в процессе образования сетчатой структуры. В последнее время гидрогелевые материалы часто используются в качестве искусственного внеклеточного матрикса из-за их структурного сходства с нативным внеклеточным матриксом человека, а также из-за возможности регулировать их многообразные свойства. В качестве клеточной микросреды (матрикса, носителя) на основе различных технологий сшивки был разработан ряд синтетических, природных и полусинтетических гидрогелей. В данном обзоре обсуждаются вопросы создания формируемых *in situ* гидрогелей с регулируемыми физическими, химическими и биологическими свойствами. Будет сделан также анализ новых методов применения инновационных гидрогелевых материалов для создания клеточной микросреды как матрикса для биомедицинских тканевых продуктов, так и систем доставки клеток и лекарственных веществ.

Ключевые слова: полимерный гидрогель, формируемый гидрогель, сшивка, тканевая инженерия, регенеративная медицина, клеточная микросреда, имплантат, носитель.

IN SITU CROSSLINKABLE HYDROGELS FOR ENGINEERED CELLULAR MICROENVIRONMENTS

Kyung Min Park¹, Ki Dong Park², V.I. Sevastianov³, E.A. Nemetz³, V.N. Vasilets³

¹ Division of Bioengineering, College of Life Sciences and Bioengineering, Incheon National University, Incheon 22012, Republic of Korea

² Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 443-749, Republic of Korea

³ V.I. Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

In situ crosslinkable hydrogels have been widely used as therapeutic implants and vehicles for a broad range of biomedical applications including tissue regenerative medicine because of their biocompatibility and easiness of encapsulation of cells or signaling molecules during hydrogel formation. Recently, these hydrogel materials have been widely utilized as an artificial extracellular matrix (aECM) because of its structural similarity with the native extracellular matrix (ECM) of the human body and its multi-tunable properties. Various synthetic, natural, and semisynthetic hydrogels have been developed as engineered cellular microenvironments by using various crosslinking strategies. In this review, we discuss how *in situ* forming hydrogels are being created with tunable physical, chemical, and biological properties. In particular, we focus on emerging techniques to apply advanced hydrogel materials for engineered cellular microenvironments.

Key words: polymeric hydrogel, *in situ* forming hydrogel, crosslinkable hydrogel, tissue engineering, regenerative medicine, engineered cellular microenvironments, implant, carrier.

Corresponding author: Ki Dong Park. Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, 5 Woncheon, Yeongtong, Suwon 443-749, Republic of Korea.
Tel. +82-31-219-1846. E-mail address: kdp@ajou.ac.kr

ВВЕДЕНИЕ

Полимерные гидрогели представляют собой гидрофильные трехмерные (3D) сетки, которые поглощают и удерживают большое количество воды [1, 2]. Эти полимерные системы широко используются в качестве терапевтических имплантатов и систем доставки для различных биомедицинских применений, включая тканевую инженерию, регенеративную медицину и доставку лекарств [3–6]. Гидрогели можно разделить на два типа в соответствии с методами их получения: предварительно сформированные гидрогели и формируемые *in situ* гидрогели. В частности, формируемые *in situ* гидрогели привлекают значительное внимание как искусственная микросреда из-за простоты инкапсуляции клеток, сигнальных молекул или лекарственных субстанций в процессе формирования гидрогеля [7]. Для создания формируемых *in situ* гидрогелей используются различные природные, синтетические и полусинтетические полимеры, включая полисахариды, белки, синтетические полимеры и их производные [8]. С помощью этих разнообразных материалов были разработаны различные технологии сшивки для формирования полимерных сеток *in situ*, включая физические и химические методы. Кроме того, можно легко изменять физико-химические свойства гидрогелей путем варьирования концентрации полимеров, состава полимерной композиции, степени сшивки и способов формирования полимерной сетки. Помимо этого, биологическую активность этих гидрогелевых материалов можно просто регулировать модифицированием (прививкой) различных биоактивных молекул (например, клеточных адгезивных пептидов и протеолитических пептидов). Эти уникальные свойства позволили использовать формируемые *in situ* гидрогели для решения различных биомедицинских задач, включая разработку биоинженерных конструкций тканей для регенеративной медицины, платформ для скрининга лекарств и изучения фундаментальных вопросов клеточной биологии.

В этом обзоре мы обсудим, как создавать формируемые *in situ* гидрогели с регулируемыми свойствами и как их можно использовать в качестве искусственных внеклеточных матриц (ВКМ) для создания инженерных моделей тканей в сочетании с новыми технологиями для инновационных биомедицинских применений, включая регенеративную медицину тканей и возможные альтернативы экспериментальным моделям с животными.

ИЗГОТОВЛЕНИЕ ФОРМИРУЕМЫХ *IN SITU* ГИДРОГЕЛЕЙ С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ СШИВКИ

В зависимости от метода сшивки используют два типа технологий для изготовления формируемых *in situ* гидрогелей: физическая или химическая сшивка (рис. 1). Физические методы сшивки включают ионную сшивку, чувствительную к стимуляции самосборку (например, термочувствительную или pH-чувствительную) и взаимодействие типа «хозяин–гость». Физическая сшивка удобна тем, что гелеобразование (образование сетчатой структуры) обычно происходит в мягких условиях и водном растворе без химических сшивающих агентов или катализаторов, которые могут обладать токсичностью. Недостатком физической сшивки является высокая вязкость образующихся исходных гелей, что вызывает проблемы с достижением равномерного распределения в них лекарственных средств, факторов роста и клеток. Кроме того, низкие механические свойства физически сшитых гидрогелей могут ограничивать их применение в различных областях биомедицинских исследований.

Химическая сшивка включает в себя фотосшивку, клик-реакцию и фермент-опосредованную сшивку. По сравнению со способами физической сшивки химически сшитые гидрогели проявляют более высокие механические свойства за счет образования ковалентных химических связей. Кроме того, вязкость исходного раствора может быть от-

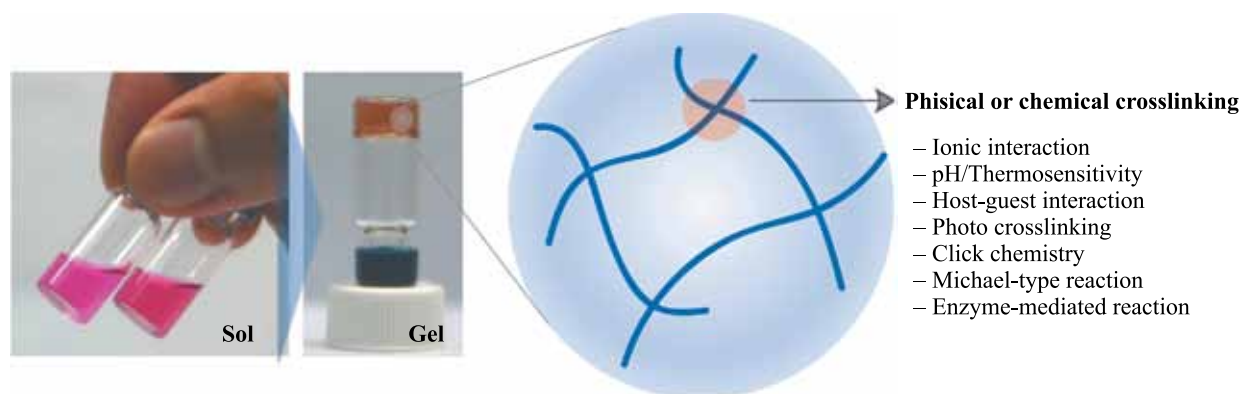


Рис. 1. Схематическое изображение формирования гидрогеля *in situ* с помощью различных реакций физической и химической сшивки

носителем низкой благодаря возможности варьирования различных технологических параметров в процессе химической сшивки. Однако катализатор, используемый для формирования сетки, может обладать токсичностью. В этом разделе мы обсудим современные подходы к созданию формируемых *in situ* гидрогелей с регулируемыми свойствами с помощью различных методов физической или химической сшивки.

Физическая сшивка

Способ ионной сшивки наиболее широко используется для изготовления формируемых *in situ* гидрогелей и может быть привлечен для образования полимерных сеток, включая поликарбоксилаты, использующие ди- и/или трехвалентные ионы (например, кальций $[Ca^{2+}]$, барий $[Ba^{2+}]$ и магний $[Mg^{2+}]$) [9]. Альгинат – анионный полисахарид, содержащийся в клеточных мембранах бурых водорослей, часто применяют для создания ионно-сшитых гидрогелей. Альгинатные гидрогели быстро образуют гидрогелевую сетку при внесении в полимерный раствор ионов Ca^{2+} . Физико-химические свойства альгинатных гидрогелей можно легко контролировать, варьируя либо концентрации полимера, либо содержание ионов Ca^{2+} . Благодаря простому процессу изготовления и биосовместимым свойствам, гидрогели на основе альгината широко используют в регенеративной медицине, для заживления ран и систем доставки клеток и лекарственных веществ [10–12]. Хотя известно применение альгинатных гидрогелей в качестве инъекционных матриц, в том числе в виде макрокапсул, но недостатками этих гелей являются низкие механические свойства и потеря функциональной активности инкапсулированных в них клеток. Tseng et al. разработали на основе альгината инъекционные и самовосстанавливающиеся гидрогелевые материалы для улучшения механических свойств и для минимизации механического раздражения [13]. Они синтезировали гидрогели, просто смешивая альгинат и ионы Ca^{2+} в присутствии бензальдегидных бифункциональных молекул ПЭГ (DF-PEG), которые индуцируют свойства самовосстановления. Механические свойства и способность к самовосстановлению гидрогелей характеризовались реологическим анализом в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} или концентраций DF-PEG, что позволяло увеличивать механическую прочность (~1,5 кПа) и индуцировало эффект самовосстановления (0,01~1,0 кПа). Авторы заметили, что нервные стволовые клетки (NSCs), инкапсулированные в функционализированные гидрогели, демонстрируют более высокую скорость пролиферации, лучшее образование сфероидов и усиление нейронной дифференциации по

сравнению с контрольными альгинатными гидрогелями. Этот результат показал, что альгинатные инъекционные и самовосстанавливающиеся гидрогели обладают большим потенциалом для восстановления центральной нервной системы. Недавно группа Lako разработала альгинатные гидрогели, конъюгированные с клеточным адгезивным пептидом RGD (Arg-Gly-Asp) для усиления клеточной активности гидрогелей [14]. Пептидные звенья ковалентно встраивали в альгинатный полимерный каркас с последующей сшивкой полимерного хлоридом кальция ($CaCl_2$). При оценке влияния концентраций RGD на дифференцировку нервной сетчатки эмбриональных стволовых клеток (ESs) и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSs) было обнаружено, что более высокая концентрация RGD (1,0 вес.%) приводит к эффективной дифференцировке нейронов сетчатки по сравнению с альгинатными гидрогелями, используемыми в качестве контроля. Было установлено, что RGD-модифицирование гидрогелей повышает функциональную активность культивируемых в них плюрипотентных стволовых клеток.

В последнее время растет интерес к использованию инъекционных гидрогелей, формируемых *in situ* посредством взаимодействия «хозяин–гость». При данном способе физической сшивки самообразование гидрогеля происходит в мягких условиях и с легко регулируемыми свойствами. Самоорганизующиеся инъекционные гидрогели образуются путем взаимодействия циклодекстринов (CDs), природных циклических олигосахаридов, состоящих из 6, 7, 8 D-глюкопиранозидных единиц (α, β, γ-CD) [15]. Эти молекулы формируют гидрофобную внутреннюю полость с последующим образованием комплекса с гостевыми молекулами, такими как адамантин (Ad), ПЭГ и холестерин [16–18]. Были разработаны новые с низкой вязкостью самоорганизующиеся инъекционные гидрогели с помощью взаимодействия «хозяин–гость» с использованием Ad и CD [19]. Они синтезировали АД-сопряженный с гиалуроновой кислотой (Ad-НА, «гостевой» макромер) и β-CD-конъюгированный НА (CD-НА, «хозяина» макромер), который может генерировать образование гидрогеля *in situ* посредством взаимодействия «хозяин–гость» в каждом боковом звене в полимерной цепи. Гидрогели изготавливаются простым смешиванием двух макромерных растворов, и их физико-химические свойства (например, время гелеобразования, механическая прочность и скорость деградации) зависят от плотности сшивки и структуры сетки, которые контролируются путем изменения концентраций макромеров и степени замещения Ad и CD в полимерных цепях. Было также обнаружено, что молекулярный механизм образования гидрогеля обусловлен их низкой вязкостью,

что обеспечивает легкий процесс инъекции, а также быстрое формирование и локализацию гидрогеля в адресных участках. Все это указывает на перспективу использования таких гидрогелей в качестве терапевтических носителей для доставки лекарств.

Химическая сшивка

Репрезентативным методом химического сшивания для создания формируемых *in situ* гидрогелей является использование видимого и ультрафиолетового излучений для инициирования реакции сшивки метакрилированных полимеров с фотоинициаторами (например, Irgacure® PIs I2959, I184 и I651) [20]. Этот метод широко используется для изготовления гидрогелей для различных биомедицинских применений, включая тканевую инженерию и доставку лекарств, а также репарацию тканей и герметики [21, 22]. Группа Хадемхоссейни разработала фотополимеризующиеся гидрогели на основе желатина. Метакрилат-желатин (gelMA) синтезировали путем связывания метакрилового ангидрида (МА) с желатиновой основой, которая может образовывать гидрогелевую сетку посредством реакции фотосшивки с использованием Irgacure 2959 в качестве фотоинициатора [23]. В этой работе впервые исследовали возможность регулирования физико-химических свойств в зависимости от степени метакрилирования (низкий, 19,7 об.% МА; средний, 53,8 об.% МА; высокий, 81,4 об.% МА). Было показано, что увеличение содержания МА приводит к более высокой механической прочности и более низкому коэффициенту затвердения. Кроме того, было изучено влияние жесткости матрицы на адгезию эндотелиальных клеток (ЕС) на поверхности гидрогеля и выявлено, что жесткие гидрогели (высокое содержание МА) приводят к значительному увеличению плотности клеток и микрокапиллярных структур по сравнению с мягкими матрицами (среда МА). Эти результаты указывают на то, что фотоотверждаемые гелеобразные гели gelMA с регулируемыми свойствами обладают большим потенциалом при использовании их в качестве искусственных микро-сред, содержащих ЕС для регенерации тканей.

Растет количество доказательств, что при изготовлении сшиваемых гидрогелей *in situ* альтернативой химической сшивке является клик-реакция – химическая реакция между азидными и концевыми ацетиленовыми группами в присутствии меди (Cu [I]) с образованием связей 1,2,3-триазола, в результате чего формируется гидрогелевая сеть [24, 25]. Благодаря селективности, отсутствию токсичных агентов и сшивке в мягких условиях клик-реакция была использована для получения различных инъекционных гидрогелей для изготовления тера-

певтических систем доставки и имплантатов [26, 27]. Используя химические свойства тетразина (Tz) – норборнена (норб), Alge et. и др., разработали клик-гидрогели – аналоги искусственного ВКМ для 3D-культур клеток [28]. Был синтезирован Tz-сопряженный разветвленный ПЭГ (PEG-Tz), который может образовывать гидрогелевую сеть *in situ* за счет смешивания с матричной норб-конъюгированной металлопротеиназой. Чтобы улучшить клеточную активность матриц, норб-конъюгированные RGD-пептиды были включены *in situ* при образовании гидрогелевой сети. Механические свойства гидрогелей можно варьировать в диапазоне от 225 до 2345 Па в зависимости от содержания PEG-Tz в полимерных растворах.

Цитосовместимость клик-гидрогелей была исследована путем инкапсуляции мезенхимальных стволовых клеток человека (hMSCs). Высокая выживаемость культивированных инкапсулированных в клик-гидрогель hMSCs показывает, что сшивка посредством клик-реакции является перспективным и мощным инструментом при разработке клеточных матриц для тканевой инженерии.

Фермент-опосредованные реакции привлекательны в качестве альтернативных методов химической сшивки из-за биосовместимости и сайт-специфичности образующихся гелей [29]. Различные ферменты, включая пероксидазу хрена (HRP), транскламиназу и лакказу, применяют в качестве катализаторов при создании *in situ* формирующихся гидрогелевых материалов. В частности, опубликовано множество сообщений о разработке инъекционного гидрогеля с использованием HRP, преимуществами которого являются отличная биосовместимость и легкость контроля за физико-химическими и биологическими свойствами гидрогелей, включая время гелеобразования, механическую прочность и биологическую активность [30–33]. Для применения в тканевой регенеративной медицине Park et al. разработали *in situ* сшиваемые гелеобразные гидрогели с использованием HRP [33]. Для изготовления HRP-опосредованных сшитых гидрогелей синтезировали тирамин-конъюгированный желатин, способный образовывать гидрогелевые сетки в процессе сшивания с помощью HRP-катализируемого соединения. В этой реакции HRP катализирует образование феноксильного радикала, который в присутствии перекиси водорода (H_2O_2) индуцирует бифенольное образование в полимерной цепи. Время гелеобразования (от 5 до 60 секунд) и механическую прочность (от 200 до 8400 Па) гидрогелей можно легко регулировать, варьируя концентрацию либо HRP (0,007–0,5 мг/мл), либо H_2O_2 (0,01–0,25 мас. %). Исследование влияния жесткости матрицы на сфероиды из дермальных фибробластов человека (hDFBs) проде-

монстрировало, что hDFBs, инкапсулированные в мягкие гидрогели (1800 Па), демонстрируют более высокую пролиферативную активность клеток, чем культивированные в жестких матрицах (5900 Па). Полученные результаты позволяют предположить, что HRP-опосредованные желатиновые гидрогели с превосходной биологической активностью и реконфигурируемыми физико-химическими свойствами являются перспективными материалами для инъекционных форм в тканевой регенеративной медицине и для различных биомедицинских применений.

В последнее время Park et al. разработали лакказо-опосредованные кислород (O_2) контролируемые гидрогели в качестве инъектируемых и гипоксия-индуцированных (HI) гидрогелей [34]. Для создания гидрогелей, регулируемых содержанием O_2 , синтезировали конъюгат желатин-феруловая кислота (gelFA), который может образовывать гидрогели *in situ* в реакции, связанной со сшиванием лакказой. В этой реакции лакказа катализирует образование diFA, которое индуцирует формирование 3D-полимерных сетей путем потребления O_2 . Было продемонстрировано, что уровни O_2 и градиенты в объеме гидрогелевых матриц можно точно контролировать и прогнозировать с помощью прямых измерений O_2 и компьютерного моделирования с использованием математического анализа. При этом на уровне растворенного O_2 (DO) и уровень потребления O_2 влияет ряд факторов (например, степень замещения FA, содержание полимера, концентрация лакказы и толщина гидрогеля), а расход потребления O_2 соответствует теоретическому уравнению Михаэлиса–Ментен. Интересно отметить, что для более толстых образцов гидрогелей (>2,5 мм) гипоксический уровень (0,5–5%) достигался быстрее, что свидетельствует в пользу их потенциального применения в качестве гипоксически-индуцируемого инъекционного гидрогеля. Кроме того, было исследовано влияние давления O_2 на дифференцировку эндотелиальных клеток-предшественников (EPCs). Было обнаружено, что EPCs в гипоксическом микроокружении прошли тубулогенез, что привело к созданию сложной сетчатой структуры с образованием просвета. Это свидетельствует о том, что HI-гель стимулирует сосудистый морфогенез и образование сетчатой структуры прогениторных васкулярных клеток человека.

Полученные результаты демонстрируют, что HI-гидрогели представляют собой новый класс инъекционных биоматериалов, которые могут оказаться востребованными в различных областях биомедицины, включая фундаментальные исследования регенеративных процессов, связанных с лечением гипоксических нарушений.

IN SITU ФОРМИРУЕМЫЕ ГИДРОГЕЛИ КАК БИОИНЖЕНЕРНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ МИКРОСРЕДЫ

Хорошо известно, что нативный ВКМ играет основную роль в регулировании клеточной активности (например, рост клеток, миграция и дифференцировка) [8]. ВКМ состоят из структурных белков, полисахаридов и различных растворимых факторов, которые характеризуются множеством физико-химических свойств, включая pH, напряжение и градиенты O_2 , механической прочностью и топологией. Как обсуждалось, гидрогелевые материалы с регулируемыми свойствами имеют структурное сходство с нативным ВКМ. Поэтому *in situ* сшиваемые гидрогели широко используются в качестве искусственного ВКМ для различных биомедицинских применений, включая тканевую регенеративную медицину и 3D-клеточные или органые конструкции (шаблоны) для создания биоинженерных тканей. Используя биоинженерные ВКМ, многие исследователи создали модели в виде трехмерных ткане- и клеточно-инженерных конструкций для регенерации тканей, а также как альтернативы экспериментальным моделям на животных и традиционным системам культуральных клеток для скрининга лекарственных веществ или для проведения фундаментальных исследований в области физиологии и патофизиологии органов и тканей (рис. 2) [35, 36].

Биоинженерные ткани изготавливают путем инкапсулирования клеток посредством физической или химической сшивки. Для обеспечения необходимого клеточного микроокружения гидрогели адаптируются для поддержания жизнедеятельности конкретных клеток. Модели биоинженерных тканей широко используются в качестве платформы для широкого спектра биомедицинских применений, включая регенеративную медицину тканей, а также как альтернативы экспериментальным моделям на животных для улучшения клинических результатов [35].

Выделение и поддержание стволовых клеток миокарда (CSC) по-прежнему является проблемой при регенерации тканей сердца, поскольку CSC не могут быть выделены и отделены с помощью обычных 2D-систем культивирования клеток или тканей. Choi et al. использовали HRP-опосредованные *in situ* сшиваемые желатиновые гидрогели в качестве искусственной внеклеточной микросреды с регулируемыми механическими свойствами для контролируемого поведения клеток и кардиомиогенной судьбы стволовых клеток ткани сердца мыши [33]. Ткани сердца мыши инкапсулировали в гидрогеле с различной жесткостью матрицы и культивировали до 7 дней в стандартных условиях культивирования (37 °C и 5% CO_2). CSC, выращенные из сердечных

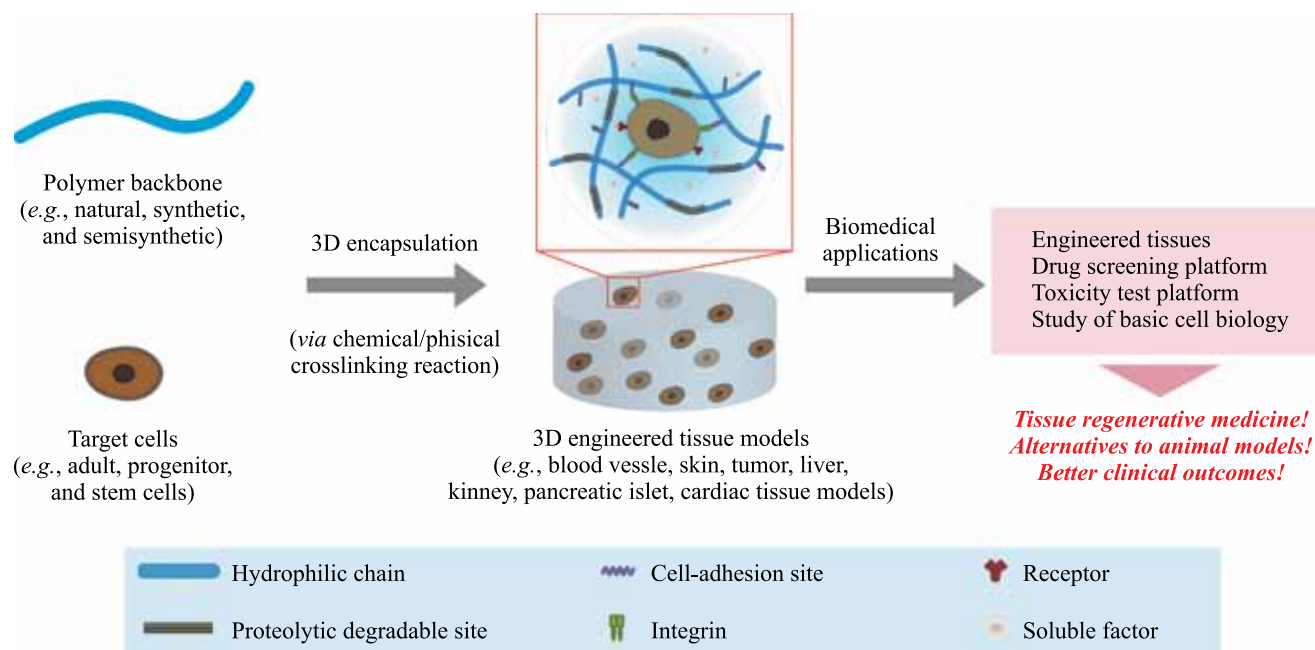


Рис. 2. Тканеинженерные модели для широкого спектра биомедицинских применений (взято с изменениями из [35])

тканей в гидрогеле, легко выделялись путем протеолитической деградации матрицы из желатина. Жесткость матрикса контролировали путем изменения концентрации катализаторов в диапазоне от 0,0038 до 0,0075 мас.%, что позволяло варьировать жесткость матрицы в диапазоне от 1,8 до 8,1 кПа. Интересно отметить, что снижение жесткости матрицы приводило к повышению активности фосфорилированных интегрин-опосредованных сигнальных молекул в CSC, что связано со значительным увеличением количества распластывающихся, мигрирующих и пролиферирующих CSC. Было также проанализировано, поддерживали ли изолированные CSC свою стволовость, а также показана отличная способность дифференцироваться в ткани миокарда. Таким образом, показано, что трехмерные биоинженерные клеточные микросреды способны контролировать деятельность CSC и регулировать дифференцировку клеток в кардиомиогенном направлении. Таким образом, разработанные системы культивирования органов могут служить инновационным шаблоном для изучения реакции CSC на механические характеристики трехмерного микроокружения, а также для разработки новых терапевтических инструментов регенерации миокарда *in situ*.

Гипоксия (определяемая как низкое давление O_2 , $<5\% pO_2$) является критическим фактором в прогрессировании и метастазировании многих видов рака [37–40]. Хорошо известно, что тяжелая депривация O_2 , вызванная неконтролируемой пролиферацией рака и ростом опухоли, играет ключевую роль в развитии опухолей и метастазах, которые вызывают аномальный ангиогенез опухолей и ремодели-

рование матриц нативной микрофлоры опухолей. Группа Gerecht использовала O_2 -контролируемые *in situ* сшиваемые гидрогели в качестве сконструированной физиопатологической гипоксической опухолевой микросреды для исследования влияния O_2 на прогрессирование опухоли [34–36]. Небольшие опухолевые трансплантаты были инкапсулированы в матрицы гидрогеля с различным давлением и градиентами O_2 (гипоксическими и не гипоксическими) и культивировались до 5 дней. Давление и градиенты O_2 контролировались изменением толщины гидрогеля (гипоксические гидрогели высотой 2,5 мм, негипоксические – высотой 1,25 мм). Примечательно, что опухоли, инкапсулированные в гипоксические микросреды, показали повышенную инвазию, которая формировалась быстрее и покрывала большее расстояние по сравнению с негипоксическими микросредами, демонстрируя, что низкое давление O_2 способствовало инвазии опухолей. Кроме того, было отмечено, что гипоксическое микроокружение повышает отложение коллагена за счет активации гипоксии-индуцированных факторов, критических факторов в опухолевой миграции и инвазии, что обосновывает важное значение низкого давления O_2 для ремоделирования микроокружения опухоли в матрице. Таким образом, условия искусственной гипоксии микроокружения имеют большой потенциал в качестве системы для изучения прогрессии и метастазирования гипоксии-индуцированного рака. В рамках разработки новых препаратов для лечения рака предложенные конструкции гипоксичной опухоли были использованы в качестве 3D-моделей для тестирования потенциальных терапевтических средств, таких как минок-

сидил, ингибитор гипоксии-опосредованного мета-стазирования опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом обзоре мы обсудили гидрогели, формирующиеся *in situ*, для широкого спектра биомедицинских применений. Целый ряд гидрогелей, сформированных при помощи физических или химических методов сшивки и обладающих биосовместимыми и мультирегулируемыми свойствами, был предложен в качестве биоинженерной микросреды клеток. Хотя полимерные матрицы широко используются для разработки инновационных терапевтических инструментов для регенерации тканей в клинике, их физико-химические, а также биологические свойства сложно точно контролировать. Ожидается,

что в будущем для более эффективного и более широкого применения в биомедицинских целях будет создан сшиваемый *in situ* гидрогель, обладающий высокой биосовместимостью и позволяющий точно имитировать свойства естественного внеклеточного матрикса.

Работа выполнена при поддержке гранта «Основные исследовательские программы науки в рамках Национального исследовательского Фонда Кореи (НРФ)», финансируемого Министерством науки, ИКТ и планирования будущего (2015R1A2A1A14027221) и гранта НРФ, финансируемого правительством Кореи (2015R1C1A1A01054498).

Статья поступила в редакцию 10.04.2017 г.

INTRODUCTION

Polymeric hydrogels are hydrophilic three-dimensional (3D) networks that absorb and retain a large amount of water [1, 2]. These polymeric matrices have been widely utilized as therapeutic implants and vesicles for various biomedical applications, including tissue regenerative medicine and drug delivery [3–6]. Hydrogels are classified into two types according to their manufacturing methods, including either preformed or *in situ*-formed hydrogels. In particular, *in situ*-formed hydrogels have received considerable attention as artificial cellular microenvironments because of ease of encapsulation of the cells or signaling molecules during hydrogel formation [7]. Various natural, synthetic, and semisynthetic polymers have been utilized to create the *in situ*-forming hydrogels, including polysaccharides, proteins, synthetic polymers, and their derivatives [8]. With these diverse materials, various crosslinking strategies have been developed to form polymeric networks *in situ*, including physical and chemical crosslinking reactions. In addition, the hydrogels can easily control the physicochemical properties by varying the concentration of the polymers, the polymer composition, the degree of crosslinking, and the crosslinking methods. Furthermore, the biological activity of these hydrogel materials can be easily controlled by tailoring with various bioactive molecules (*e.g.*, cell adhesive peptides and proteolytic degradable sites). These unique properties have allowed *in situ*-forming hydrogels to be applied to a broad range of biomedical applications including engineered tissue models for tissue regenerative medicine, drug screening platforms and study of basic cell biology.

In this review, we discuss how to create the *in situ* forming hydrogels with tunable properties and how the

hydrogels can be utilized as artificial extracellular matrices (aECMs) to create engineered tissue models in combination with the emerging techniques for innovative biomedical applications including tissue regenerative medicine and alternatives to animal models.

FABRICATION OF *IN SITU* CROSSLINKABLE HYDROGELS VIA VARIOUS CROSSLINKING STRATEGIES

Based on their crosslinking methods, two kinds of strategies are used for fabrication of *in situ* crosslinkable hydrogels: physical crosslinking and chemical crosslinking (Fig. 1). Physical crosslinking methods involve ionic crosslinking, stimuli-sensitive self-assembly (*e.g.*, thermo-responsive and pH-sensitive), and host-guest interaction. This physical crosslinking is advantageous in that the gelation often occurs in mild conditions and aqueous solution without chemical crosslinkers or catalysts that may cause toxicity, but it has a disadvantage that it is difficult to uniformly encapsulate therapeutic drugs (*e.g.*, growth factors, and even cells) because of the high viscosity of the precursor polymer solutions. In addition, low mechanical properties of physically crosslinked hydrogels may limit their applications in a broad range of biomedical research fields. Chemical crosslinking approaches implicate photocrosslinking, Click-chemistry, and enzyme-mediated crosslinking. In comparison with the physical crosslinking, chemically crosslinked hydrogels exhibit higher mechanical properties *via* network formation through covalent bonds. Additionally, the viscosity of the precursor solution is relatively low so that it is easy to handle and to control their physicochemical properties by controlling various parameters. The catalyst used for network formation has the potential to cause toxicity. In this section, we

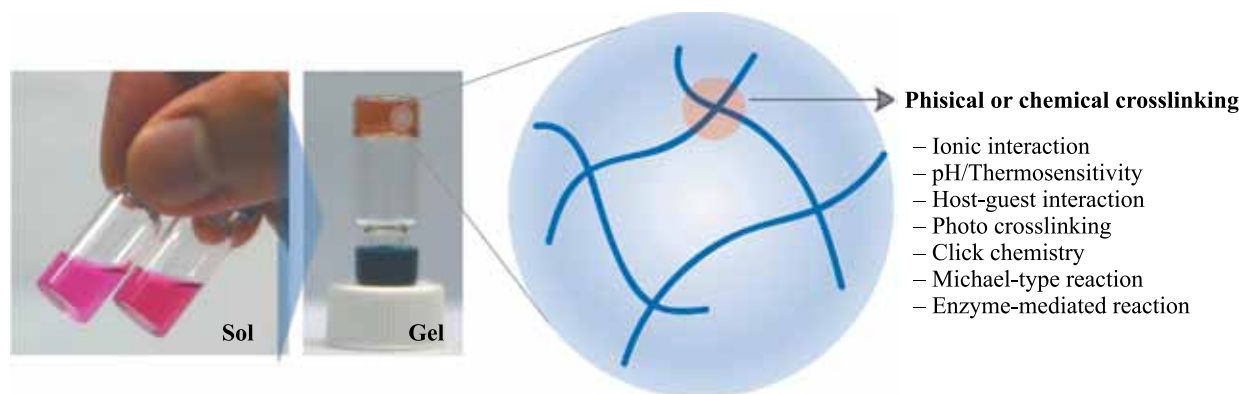


Fig. 1. Schematic representation of *in situ* hydrogel formation via various physical and chemical crosslinking reactions

discuss the current approaches to create *in situ*-forming hydrogels via various physical and chemical crosslinking strategies as well as their tunable properties.

Physical crosslinking reactions

The ionic crosslinking method is the most widely used to fabricate *in situ* forming hydrogels and can be used to form polymer networks including polycarboxylates using di- and/or trivalent ions (*e.g.*, calcium $[Ca^{2+}]$, barium $[Ba^{2+}]$, and magnesium $[Mg^{2+}]$) [9]. Alginate, an anionic polysaccharide distributed widely in the cell walls of brown algae has been commonly used to create ionic crosslinked hydrogels. Alginate hydrogels rapidly form a hydrogel network when the polymer solution comes in contact with Ca^{2+} ions. The physicochemical properties of alginate hydrogels can be easily controlled by varying either polymer concentrations or Ca^{2+} ion contents. Based on their easy fabrication process and biocompatibility, alginate-based hydrogels have been widely used in various regenerative medicine, wound management, and drug delivery systems [10–12]. While alginate hydrogels have been widely utilized as injectable matrices, they have limitations such as low mechanical properties and encapsulated cell activity. Tseng et al. developed alginate-based injectable and self-healing hydrogel materials to improve mechanical properties and to minimize mechanical irritation [13]. They synthesized the hydrogels by simply mixing alginate and Ca^{2+} ions in the presence of benzaldehyde difunctionalized-PEG (DF-PEG) molecules that induce self-healing properties. The mechanical properties and self-healing capacity of the hydrogels were characterized by rheological analysis depending on either Ca^{2+} ions or DF-PEG concentrations, resulting in tunable mechanical strength (~ 1.5 kPa) and self-healing properties (0.01–1.0 kPa). They noticed that neural stem cells (NSCs) encapsulated within the functionalized hydrogels exhibited a higher proliferation rate, larger spheroid formation, and enhanced neural differentiation compared with the controls (alginate hydrogels). This result suggested that alginate-based injectable and

self-healing hydrogels have great potential in central nervous system repair applications. Recently, the Lako group developed alginate hydrogels conjugated with cell adhesive peptide (Arg-Gly-Asp, RGD) to enhance cellular activity of the hydrogels [14]. They covalently conjugated the peptide sequences into the alginate polymer backbone and fabricated hydrogels using calcium chloride ($CaCl_2$). They evaluated the effect of RGD concentrations on neural retina differentiation of embryonic stem cells (ESs) and induced-pluripotent stem cells (iPSs), demonstrating that a higher concentration of RGD (1.0 wt%) resulted in effective neural retina differentiation compared with alginate hydrogels as a control. The result suggested that RGD conjugation enhanced pluripotent stem cell activity in the hydrogels.

Recently, there has been a growing interest in using injectable hydrogels through host-guest interaction as hydrogel formation occurs in mild conditions with tunable properties. The self-assembling injectable hydrogels are formed through the interaction of the cyclodextrins (CDs), natural cyclic oligosaccharides composed of 6, 7, 8 D-glucopyranoside units (α , β , γ -CD) [15]. These molecules include a hydrophobic inner cavity that induces an inclusion complex with other guest molecules such as adamantane (Ad), PEG, and cholesterol [16–18]. Christopher et al. developed novel shear thinning and self-assembling injectable hydrogels through host-guest interaction using Ad and CDs [19]. They synthesized Ad-conjugated hyaluronic acid (Ad-HA, a guest macromer) and β -CD-conjugated HA (CD-HA, a host macromer), which can generate *in situ* hydrogel formation through host-guest interaction in each pendent in the polymer backbone. The hydrogels are fabricated by simple mixing of the two macromer solutions and their physicochemical properties (*e.g.*, gelation time, mechanical strength, and degradation behavior) were dependent on crosslinking density and network structure, which are controlled by varying macromer concentrations and degree of substitution of Ad and CDs in the polymer chains. Interestingly, they also found that the molecular mechanism of hydrogel formation relied

on shear-thinning behavior to enable an easy injection process as well as rapid recovery to localize the hydrogels on the target sites, suggesting promising potential of hydrogels as therapeutic delivery carriers.

Chemical crosslinking reactions

The representative chemical crosslinking method to create *in situ* forming hydrogels is photocrosslinking using visible and UV irradiation. In this reaction, visible and UV light sources initiate the crosslinking reaction of methacrylated-polymers with photoinitiators (e.g., Irgacure® PIs I2959, I184, and I651) [20]. This method has been widely used to fabricate the hydrogels for various biomedical applications including tissue regeneration and drug delivery, as well as tissue restoration and sealants [21, 22]. The Khademhosseini group developed photopolymerizable gelatin-based hydrogels. The methacrylated-gelatin (gelMA) was synthesized by coupling of methacrylic anhydride (MA) to a gelatin backbone that can form a hydrogel network through photocrosslinking reaction using Irgacure 2959 as a photoinitiator [23]. They first investigated the controllable physicochemical properties depending on the degree of methacrylation (low, 19.7 volume%MA; medium, 53.8 volume%MA; high, 81.4 volume%MA), resulting in higher mechanical strength and a lower sealing ratio with increasing MA contents. In addition, they examined the effect of matrix stiffness on endothelial cell (EC) adhesion on the hydrogel surfaces, showing that stiff hydrogels (high MA contents) resulted in significantly increased cell density and micro capillary structures of ECs compared with the soft matrices (medium MA contents). These results demonstrated that photocurable gelMA hydrogels with tunable properties have great potential as artificial EC microenvironments for tissue regenerative medicine.

Growing evidence demonstrates that click chemistry is an alternative chemical crosslinking strategy to fabricate crosslinkable hydrogels *in situ*. This chemical reaction implicates a copper (Cu[I])-mediated reaction between azide and terminal acetylene groups, resulting in 1,2,3-triazole bonds that induce hydrogel network formation [24, 25]. Because of its regioselectivity, absence of toxic crosslinking agents, and rapid crosslinking reactivity under mild conditions, the click reaction has been used to generate various injectable hydrogels that have been utilized as therapeutic vesicles and implants [26, 27]. Alge et al. developed click hydrogels as aECMs for 3D cell culture using tetrazine (Tz)-Norbornene (norb) chemistry [28]. Tz-conjugated multi-arm PEG (PEG-Tz) was synthesized, which can form an *in situ* hydrogel network by mixing with norb-conjugated matrix metalloproteinase (MMPs). In order to improve cellular activity of the matrices, norb-conjugated RGD peptides were incorporated *in situ* during hydrogel net-

work formation. The hydrogels showed tunable mechanical properties depending on PEG-Tz contents in the polymer solutions, ranging from 225 to 2345 Pa. Cyto-compatibility of the hydrogels was investigated by encapsulating human mesenchymal stem cells (hMSCs), demonstrating that cytocompatible crosslinking reaction led to high post-encapsulation viability of hMSCs. These results demonstrated that this click crosslinking reaction is an interesting and powerful tool for developing engineered cellular matrices for tissue engineering applications.

Enzyme-mediated crosslinking reactions have attracted attention as an alternative chemical crosslinking method because of their biocompatibility and site-specificity [29]. Various enzymes have been utilized as catalysts to create *in situ*-forming hydrogel materials, including horseradish-peroxidase (HRP), transglutaminase (TG), and laccase. In particular, there have been numerous reports on the development of an injectable hydrogel using HRP because of its excellent biocompatibility and the ease of control of physicochemical and biological properties of the hydrogels, including gelation time, mechanical strength, and biological activities [30–33]. Park et al. developed *in situ* crosslinkable gelatin-based hydrogels using HRP chemistry for tissue regenerative medicine [33]. To fabricate HRP-mediated crosslinked hydrogels, tyramine-conjugated gelatin was synthesized, which can form hydrogel networks in an HRP-catalyzed crosslinking reaction. In this reaction, HRP catalyzes phenoxyl radical formation that induces diphenolic formation in the polymer backbone in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2). They found that the gelation time (ranging from 5 to 60 sec) and mechanical strength (ranging from 200 to 8400 Pa) of hydrogels could be easily controlled by varying either HRP (0.007–0.5 mg/mL) or H_2O_2 (0.01–0.25 wt%) concentrations. They also investigated the effect of matrix stiffness on 3D human dermal fibroblasts (hDFBs), and found that hDFBs encapsulated within soft hydrogels (1800 Pa) exhibited higher cell proliferation than those cultured in stiff matrices (5900 Pa). These results suggested that the HRP-mediated gelatin hydrogels with excellent bioactivity and tunable physicochemical properties are promising injectable materials in tissue regenerative medicine and various biomedical applications.

Recently, Park et al. developed laccase-mediated oxygen (O_2) controllable hydrogels as injectable and hypoxia-inducible (HI) hydrogels [34]. In order to create O_2 -controllable hydrogels, ferulic acid (FA)-conjugated gelatin was synthesized, which can form *in situ* hydrogels in the laccase-mediated crosslinking reaction. In this reaction, laccase catalyzes diFA formation that induces 3D polymeric networks *via* O_2 consumption. They demonstrated that the O_2 levels and gradients throughout the hydrogel matrices can be accurately controlled and precisely predicted by direct

O₂ measurements and computer simulation using mathematical analysis. They found that dissolved O₂ (DO) levels and O₂ consumption rates were affected by a number of factors (*i.e.*, degree of substitution of FA, polymer contents, laccase concentrations, and hydrogel thickness) and that the O₂ consumption rate follows the theoretical Michaelis-Menten equation. Interestingly, we noticed that thicker hydrogels (>2.5 mm thickness) reached hypoxic levels (0.5–5%) when the culture media was placed through DO measurement and computer simulation, suggesting their potential application as a hypoxia-inducible and injectable hydrogel. In addition, they examined the effect of O₂ tension on vascular differentiation of endothelial progenitor cells (EPCs). We found that EPCs within hypoxic microenvironments underwent tubulogenesis resulting in complex network structure with lumen, demonstrating that the HI gel stimulates vascular morphogenesis and network formation of human vascular progenitor cells. These results demonstrated that the HI hydrogels are a new class of injectable biomaterials that may prove to be useful in various biomedical applications, including fundamental studies of regenerative processes involved in the treatment of hypoxia-regulated disorders.

IN SITU CROSSLINKABLE HYDROGELS AS ENGINEERED CELLULAR MICROENVIRONMENTS

It is well known that the native ECMs play a critical role in regulating cellular activities (*e.g.*, cell growth, migration and differentiation) [8]. The ECMs are composed of structural proteins, polysaccharides, and various soluble factors, which present a myriad of phy-

sicochemical properties including pH, O₂ tension and gradients, mechanical strength, and topology. As discussed, the hydrogel materials have structural similarities to the native ECMs with multi-tunable properties. Thus, *in situ* crosslinkable hydrogels have been widely utilized as aECMs for various biomedical uses including tissue regenerative medicine and 3D cell or organ culture templates to create engineered tissues. Using the engineered ECMs, many researchers have created engineered tissue models as 3D tissues and cell culture templates for tissue regenerative medicine as well as alternatives to animal models and traditional culture systems for drug screening for a better understanding of basic cell biology in healthy and pathological tissues (Fig. 2) [35, 36].

The engineered tissues are fabricated by encapsulating the cells *via* either physical or chemical crosslinking reactions. To provide engineered cellular microenvironments, the hydrogels are tailored with the cellular active. The engineered tissue models have been widely utilized as a platform for a wide range of biomedical applications, including tissue regenerative medicine as well as alternatives to animal models for better clinical outcomes (adopted from [35]).

Isolation and maintenance of cardiac stem cells (CSCs) is still a problem in myocardial tissue regeneration, as the CSCs cannot be isolated and separated by the conventional 2D cell or tissue culture systems. Choi et al. utilized HRP-mediated *in situ* crosslinkable gelatin hydrogels as an engineered extracellular microenvironment with tunable mechanical properties for regulating cell behavior and cardiomyogenic fate of cardiac stem cells [33]. The mouse cardiac tissues were encapsulated within the hydrogels with different matrix

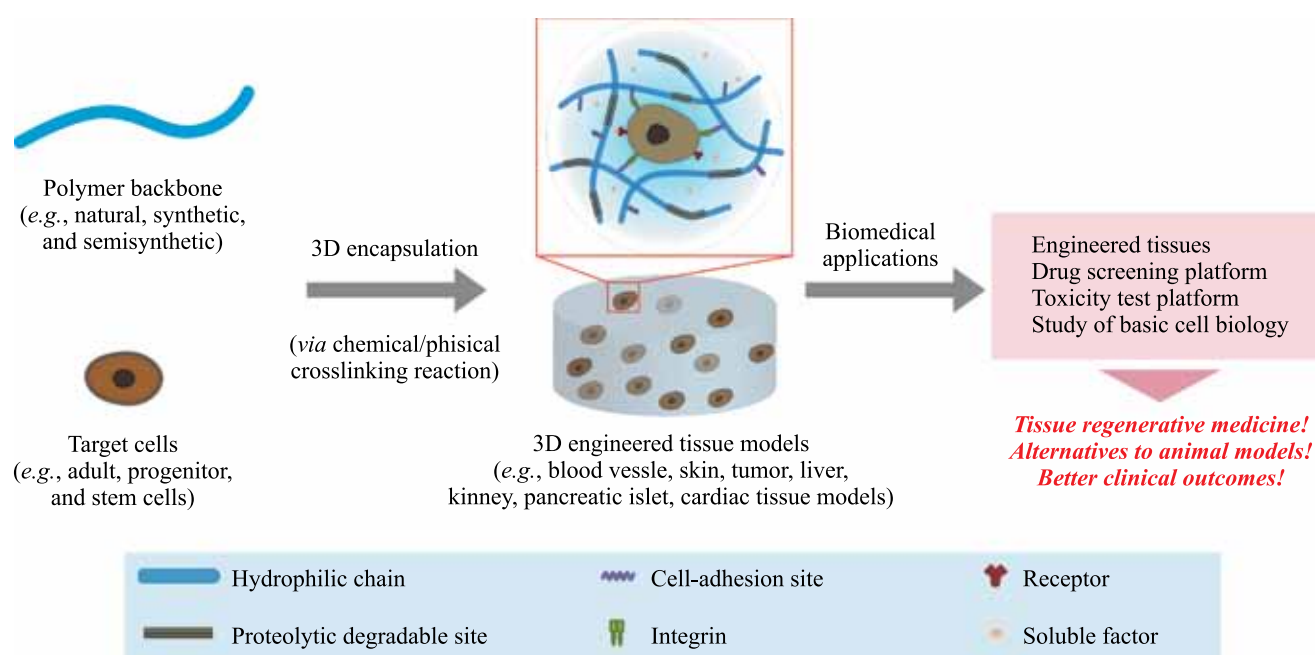


Fig. 2. Engineered tissue models for a broad range of biomedical applications

stiffness and cultured up to 7 days under standard culture conditions (37 °C and 5% CO₂). The CSCs grown into the hydrogels from the cardiac tissues were easily isolated by digesting the hydrogels *via* proteolytic degradation of the gelatin matrices. Matrix stiffness was controlled by varying the concentration of catalysts ranging from 0.0038 to 0.0075 wt%, resulting in variable matrix stiffness (1.8–8.1 kPa). Interestingly, it was demonstrated that decreasing matrix stiffness resulted in upregulation of phosphorylated integrin-mediated signaling molecules in CSCs, which are associated with significantly increasing CSC spreading, migration, and proliferation in a modulus-dependent manner. It was also evaluated whether the isolated CSCs maintained their stemness, and an excellent ability to differentiate into myocardial tissues was shown. This result demonstrated that 3D-engineered cellular microenvironments are able to control CSC activities and regulate cardiomyogenic fate, suggesting that our organ culture systems may provide an innovative template for studying the mechanoreponse of CSCs in a 3D microenvironment as well as for developing novel therapeutic tools for *in situ* myocardial regeneration.

Hypoxia (defined as low O₂ tension, <5% pO₂), is a critical factor in the progression and metastasis of many cancers [37–40]. It is well known that severe O₂ deprivation caused by the uncontrolled cancer proliferation and tumor growth play a pivotal role in tumor development and metastasis, which induce abnormal tumor angiogenesis and matrix remodeling of the native tumor microenvironments. The Gerecht group utilized O₂-controllable *in situ* crosslinkable hydrogels as engineered hypoxic tumor microenvironments to recapitulate physio-pathological tumor microenvironments for investigating the effect of O₂ on tumor progression [34–36]. The small tumor grafts were encapsulated within the hydrogel matrices with different O₂ tensions and gradients (hypoxic vs. normoxic) and were cultured up to 5 days. The O₂ tension and gradients were controlled by varying hydrogel thickness (hypoxic hydrogels, 2.5 mm height; normoxic, 1.25 mm height). Notably, they found that tumors encapsulated within hypoxic microenvironments revealed increased invasion that was both faster and covered a longer distance compared to the normoxic microenvironments, demonstrating that low O₂ tension facilitated the tumor invasion. In addition, it was noticed that the hypoxic microenvironment enhanced collagen deposition through activation of hypoxia-inducible factors (HIFs), critical factors in tumor migration and invasion, suggesting that low O₂ tension is important in matrix remodeling in tumor microenvironments. Finally, the engineered hypoxic tumor constructs were utilized as 3D tumor models to test potential therapeutics, such as minoxidil, an inhibitor of hypoxia-mediated tumor metastasis, suggesting that the artificial hypoxic microenvironments have

great potential as a system to study hypoxia-induced cancer progression and metastasis and to develop novel therapeutics for cancer treatments.

CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTION

In this review, we discussed a wide range of *in situ* forming hydrogels and their applications for a broad range of biomedical applications. With advances in materials science and engineering, numerous hydrogels formed *via* physical and chemical crosslinking methods have been explored as engineered cellular microenvironments with biocompatibility and multi-tunable properties. While the polymeric matrices are extensively used to develop innovative therapeutic tools for tissue regeneration, it is still challenging to accurately control their physicochemical properties as well as biological properties for better clinical outcomes. In the future, it is expected that an *in situ* crosslinkable hydrogel will be developed, which is more biocompatible and more accurately mimics the native ECM for more effective and wider applications in biomedical uses.

This work was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (2015R1A2A1A14027221) and by the NRF grant funded by the Korea government (MSIP) (NRF-2015R1C1A1A01054498).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Kopecek J. Hydrogel biomaterials: a smart future? *Biomaterials*. 2007; 28: 5185–5192.
2. Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Advanced materials*. 2006; 18: 1345–1360.
3. Surguchenko VA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Skaleckij NN, Sevastianov VI. The cell-engineered construct of cartilage on the basis of biopolymer hydrogel matrix and human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells (in vitro study). *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2015; 103A (2): 463–470.
4. Sevastianov VI, Dukhina GA, Ponomareva AS, Kirsanova LA, Perova NV, Skaletskiy NN. A Biomedical Cell Product for the Regeneration of Articular Cartilage: Biocompatible and Histomorphological Properties (an Experimental Model of Subcutaneous Implantation). *Inorganic Materials: Applied Research*. 2015; 6 (2): 162–170.
5. Sivashanmugam A, Kumar RA, Priya MV, Nair SV, Jayakumar R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2015; 72: 543–565.
6. Alexander AA, Khan J, Saraf S, Saraf S. Thermosensitive polymers for controlled delivery of hormones. *J. Control Release*. 2013; 172: 715–729.
7. Bae KH, Wang L-S, Kurisawa M. Injectable biodegradable hydrogels: progress and challenges. *J. Mater. Chem. B*. 2013; 1: 5371–5388.

8. Yang J-A, Yeom J, Hwang BW, Hoffman AS, Hahn SK. N-succinyl chitosan preparation, characterization, properties and biomedical applications: a state of the art review. *Prog Polym Sci.* 2014; 39: 1973–1986.
9. Atala A, Cima LG, Kim W, Paige KT, Vacanti JP, Retik AB, Vacanti CA. Injectable alginate seeded with chondrocytes as a potential treatment for vesicoureteral reux. *J. Urol.* 1993; 150: 745–747.
10. Zhao L, Weir MD, Xu HH. An injectable calcium phosphate-alginate hydrogel-umbilical cord mesenchymal stem cell paste for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2010; 31: 6502–6510.
11. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* 2007; 32: 762–798.
12. Sun J-Y, Zhao X, Illeperuma WR, Chaudhuri O, Oh KH, Mooney DJ, Vlassak JJ, Suo Z. Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature.* 2012; 489: 133–136.
13. Tseng TC, Tao L, Hsieh FY, Wei Y, Chiu IM, Hsu SH. An Injectable, Self-Healing Hydrogel to Repair the Central Nervous System. *Advanced materials.* 2015; 27: 3518–3524.
14. Hunt NC, Hallam D, Karimi A, Mellough CB, Chen J, Steel DH, Lako M. 3D culture of human pluripotent stem cells in RGD-alginate hydrogel improves retinal tissue development. *Acta biomaterialia.* 2017; 49: 329–343.
15. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and futur. *Nat. Rev. Drug Discovery.* 2004; 3: 1023–1035.
16. Li J. Self-assembled supramolecular hydrogels based on polymer – cyclodextrin inclusion complexes for drug delivery. *NPG Asia Materials.* 2010; 2: 112–118.
17. Kretschmann O, Choi SW, Miyauchi M, Tomatsu I, Harada A, Ritter H. Switchable Hydrogels Obtained by Supramolecular Cross-Linking of Adamantyl-Containing LCST Copolymers with Cyclodextrin Dimers. *Angewandte Chemie International Edition.* 2006; 45: 4361–4365.
18. Manakker F, Pot M, Vermonden T, Nostrum CF, Hennink WE. Self-assembling hydrogels based on β -cyclodextrin/cholesterol inclusion complexes. *Macromolecules.* 2008; 41 (5): 1766–1773.
19. Rodell CB, Kaminski AL, Burdick JA. Sequential cross-linking to control cellular spreading in 3-dimensional hydrogels. *Biomacromolecules.* 2013; 14 (11): 4125–4134.
20. Elisseeff J, Anseth K, Sims D, McIntosh W, Randolph M, Langer R. Transdermal photopolymerization of poly(ethylene oxide)-based injectable hydrogels for tissue-engineered cartilage. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1999; 96: 3104–3107.
21. Kramer N, Lohbauer U, García-Godoy F, Frankengerger R. Light curing of resin-based composites in the LED era. *Am. J. Dent.* 21 (3): 135–142.
22. Ifkovits JL, Burdick JA. Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation. *Tissue engineering.* 2007; 13 (10): 2369–2385.
23. Nichol JW, Koshy ST, Bae H, Hwang CM, Yamanlar S, Khademhosseini A. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials.* 2010; 31 (21): 5536–5544.
24. Binder WH, Sachsenhofer R. Click' chemistry in polymer and materials science. *Macromol Rapid Comm.* 2007; 28: 15–54.
25. Moses JE, Moorhouse AD. The growing applications of click chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 2007; 36: 1249–1262.
26. Horne WS, Yadav MK, Stout CD, Ghadiri MR. Heterocyclic Peptide Backbone Modifications in an α -Helical Coiled Coil. *J. Am. Chem. Soc.* 2004; 126 (47): 15366–15367.
27. Angelo NG, Arora PS. Nonpeptidic Foldamers from Amino Acids: Synthesis and Characterization of 1,3-Substituted Triazole Oligomers. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127 (49): 17134–17135.
28. Alge DL, Azagarsamy MA, Donohue DF, Anseth KS. Synthetically tractable click hydrogels for three-dimensional cell culture formed using tetrazine-norbornene chemistry. *Biomacromolecules.* 2013; 14: 949–953.
29. Hu J, Zhang G, Liu S. Highly selective fluorogenic multianalyte biosensors constructed via enzyme-catalyzed coupling and aggregation-induced emission. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41 (18): 5933–5949.
30. Jin R, Hiemstra C, Zhong Z, Feijen J. Enzyme-mediated fast *in situ* formation of hydrogels from dextran-tyramine conjugates. *Biomaterials.* 2007; 28: 2791–2800.
31. Park KM, Shin YM, Joun YK, Shin H, Park KD. *In situ* forming hydrogels based on tyramine conjugated 4-Arm-PPO-PEO via enzymatic oxidative reaction. *Biomacromolecules.* 2010; 11: 706–712.
32. Kurisawa M, Chung JE, Yang YY, Gao SJ, Uyama H. Chem Commun. Injectable biodegradable hydrogels composed of hyaluronic acid – tyramine conjugates for drug delivery and tissue engineering. *Chem. Commun.* 2005; 34: 4312–4314.
33. Park KM, Ko KS, Joung YK, Shin H, Park KD. *In situ* cross-linkable gelatin-poly(ethylene glycol)-tyramine hydrogel via enzyme-mediated reaction for tissue regenerative medicine. *J. Mater. Chem.* 2011; 21: 13180–13187.
34. Park KM, Gerecht S. Hypoxia-inducible hydrogels. *Nature communications.* 2014; 5: 4075.
35. Park S, Park KM. Engineered Polymeric Hydrogels for 3D Tissue Models. *Polymers.* 2016; 8 (1): 23.
36. Park KM, Gerecht S. Polymeric hydrogels as artificial extracellular microenvironments for cancer research. *Eur. Polym. J.* 2015; 72: 507–513.
37. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nature medicine.* 2013; 19: 1423–1437.
38. Junttila MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour microenvironment heterogeneity on therapeutic response. *Nature.* 2013; 501 (7467): 346–354.
39. Rizki A, Weaver VM, Lee SY, Rozenberg GI, Chin K, Myers CA et al. A human breast cell model of preinvasive to invasive transition. *Cancer Res.* 2008 Mar 1; 68 (5): 1378–1387. Cancer research. 2008; 68: 1378–1387.
40. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 2008; 8: 967–975.

The article was submitted to the journal on 10.04.2017