



ТЕОРИЯЛЫҚ ПӘНДЕР
ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ДИСЦИПЛИНЫ
THEORETICAL DISCIPLINES



ЗЕРТХАНАЛЫҚ МЕДИЦИНА
ЛАБОРАТОРНАЯ МЕДИЦИНА
LABORATORY MEDICINE

Получена: 22 сентября 2023/ Принята: 16 ноября/ Опубликовано online: 28 декабря 2023

УДК: 577.24

DOI: [10.26212/2227-1937.2023.55.94.017](https://doi.org/10.26212/2227-1937.2023.55.94.017)

А.С. Жакупова¹, ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4950-160X>

А.А. Турмухамбетова², ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4668-3295>

Т.М. Салиев³, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5696-6363>

П.Б. Сингх¹, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9571-0974>

¹ Школа Медицины Назарбаев Университет, г. Астана

² НАО «Медицинский университет Караганды», г. Караганды

³ Научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной медицины имени Б. Атабабара (НИИФПМ), г. Алматы

ПОНИМАНИЕ КОНЦЕПЦИИ ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ВОЗРАСТА

Резюме: Перепрограммирование возраста представляет собой новый метод создания пациент-специфичных тканей для трансплантации. Данный метод позволяет обойти цикл повторной дифференцировки, характерный для индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS) и ядерно-трансферных эмбриональных стволовых клеток (NT-ES). Данные технологии вызывают большой интерес в регенеративной медицине. Несмотря на очевидный потенциал клеточной терапии iPS и NT-ES, существует несколько проблем, которые необходимо преодолеть, прежде чем данные методы лечения станут безопасными и рутинными. Альтернативой вышеперечисленным методам является перепрограммирование возраста, которое направлено на омоложение специализированных функций старой клетки без прохождения де-дифференцировки. Также в отличие от клеточной терапии iPS и NT-ES, перепрограммирование возраста не требует прохождения перепрограммирования развития через эмбриональную стадию. Работы по перепрограммированию возраста были в основном сосредоточены на одном аспекте – эпигеноме. Эпигенетическое омоложение было достигнуто *in vitro* в отсутствие де-дифференцировки с использованием факторов перепрограммирования iPS клеток. Исследования динамики перепрограммирования эпигенетического возраста (eAge) показали, что отличие eAge от перепрограммирования развития может быть в значительной степени объяснено их различной кинетикой. Перепрограммирование возраста также было достигнуто *in vivo* и было показано, что оно увеличивает продолжительность жизни у мышей с преждевременным старением. В данной статье приводятся доказательства того, что перепрограммирование развития можно регулировать *in vitro* и *in vivo*, а также направления будущих исследований для углубления нашего понимания данного явления, которое даст значительные преимущества в регенеративной терапии.

Ключевые слова: перепрограммирование возраста, эпигенетическое омоложение, перенос ядер соматических клеток (SCNT), iPS клетки, факторы перепрограммирования, эпигенетические часы, eAge.

А.С. Жакупова¹, А.А. Турмухамбетова², Т.М. Салиев³, П.Б. Сингх¹

¹ Назарбаев Университет Медицина мектебі, Астана қаласы

² КЕАҚ «Қарағанды медицина университеті», Қарағанды қ.

³ Б. Атабабаров атындағы іргелі және қолданбалы медицина ғылыми-зерттеу институты, Алматы қаласы

ЖАСТЫ ҚАЙТА БАҒДАРЛАМАЛАУ ТҮСІНІГІН ТҮСІНУ

Түйін: Жасты қайта бағдарламалау – трансплантация үшін пациентке тән тіндерді жасаудың жаңа әдісі. Бұл әдіс индукцияланған плюрипотентті дің жасушаларына (iPS) және ядролық трансферттік эмбриондық дің жасушаларына (NT-ES) тән қайта дифференциация циклын айналып өтеді. Бұл технологиялар регенеративті медицинада үлкен қызығушылық тудырады. iPS және NT-ES жасушалық терапиясының көрінетін әлеуетіне қарамастан, бұл терапиялар қауіпсіз және әдеттегідей болғанға дейін бірнеше қиындықтарды жеңу қажет. Жоғарыда аталған әдістерге балама жасты қайта бағдарламалау болып табылады, ол дифференциациядан өтпей, ескі жасушаның мамандандырылған функцияларын жасартуға бағытталған. Сондай-ақ, iPS және NT-ES жасушалық терапиясынан айырмашылығы, жасты қайта бағдарламалау эмбриональды кезеңнен өту үшін дамуды қайта бағдарламалауды қажет етпейді. Жасты қайта бағдарламалау бойынша жұмыс негізінен бір аспектіге, эпигеномға бағытталған. Эпигенетикалық жасаруға iPS жасушаларын қайта бағдарламалау факторлары арқылы дифференциация болмаған жағдайда *in vitro* қол жеткізілді. Эпигенетикалық жасты қайта бағдарламалау (eAge) динамикасын зерттеу eAge және дамуды қайта бағдарламалау арасындағы айырмашылықты олардың әртүрлі кинетикасымен түсіндіруге болатынын көрсетті. Жасты қайта бағдарламалауға да *in vivo* қол жеткізілді және

мерзімінен бұрын қартайған тышқандардың өмір сүру ұзақтығын ұзартатыны көрсетілді. Бұл мақала дамуды қайта бағдарламалауды *in vitro* және *in vivo* реттеуге болатынын дәлелдейді, сондай-ақ регенеративті терапияда айтарлықтай пайда әкелетін осы құбылысты түсінуді тереңдету үшін болашақ зерттеулерге бағыттарды береді.

Түйінді сөздер: жасты қайта бағдарламалау, эпигенетикалық жасару, соматикалық жасушаның ядролық тасымалдануы (SCNT), iPS жасушалары, қайта бағдарламалау факторлары, эпигенетикалық сағат, eAge

A.S. Zhakupova¹, A.A. Turmukhambetova², T.M. Saliev³, P.B. Singh¹,

¹ School of Medicine Nazarbayev University, Astana

² NJSC "Medical University of Karaganda", Karaganda

³ Research Institute of Fundamental and Applied Medicine named after B. Atchabarov (NIIFPM)

UNDERSTANDING THE CONCEPT OF AGE REPROGRAMMING

Resume: Age reprogramming is a new method for creating patient-specific tissues for transplantation. This method bypasses the re-differentiation cycle characteristic of induced pluripotent stem cells (iPS) and nuclear transfer embryonic stem cells (NT-ES). These technologies are of great interest in regenerative medicine. Despite the apparent potential of iPS and NT-ES cell therapies, there are several challenges that need to be overcome before these therapies become safe and routine. An alternative to the above methods is age reprogramming, which aims to rejuvenate the specialized functions of an old cell without undergoing de-differentiation. Also unlike iPS and NT-ES cell therapy, age reprogramming does not require developmental reprogramming to go through the embryonic stage. The work on age reprogramming has mainly focused on one aspect, the epigenome. Epigenetic rejuvenation was achieved *in vitro* in the absence of de-differentiation using iPS cell reprogramming factors. Studies of the dynamics of epigenetic age reprogramming (eAge) have shown that the difference between eAge and developmental reprogramming can be largely explained by their different kinetics. Age reprogramming has also been achieved *in vivo* and has been shown to increase lifespan in prematurely aging mice. This article provides evidence that developmental reprogramming can be regulated *in vitro* and *in vivo*, as well as directions for future research to deepen our understanding of this phenomenon, which will bring significant benefits in regenerative therapy.

Keywords: age reprogramming, epigenetic rejuvenation, somatic cell nuclear transfer (SCNT), iPS cells, reprogramming factors, epigenetic clock, eAge.

ВВЕДЕНИЕ. Эксперименты по клонированию животных, основанные на трансплантации ядер соматических клеток (somatic cell nuclear transfer, SCNT) выявили, что старение является обратимым процессом. Изначально пересадка ядер соматических клеток применялась к земноводным [1,2], а затем – к млекопитающим [3]. Эти важные исследования показали, что перепрограммирование ядра соматической клетки является процессом, при котором зрелые дифференцированные клетки вновь приобретают способность к развитию и возрастной потенциал. Результатом этого процесса явился новорожденный клон, генетически идентичный соматической клетке, перенесенной в ооцит-реципиент. Данный клон обладает нормальной продолжительностью жизни, несмотря на то, что для его создания была использована соматическая клетка стареющего донора [4,5].

Таким образом, с помощью пересадки ядер соматических клеток можно повернуть вспять возрастные изменения старых клеток. В недавних фундаментальных исследованиях Яманака и его коллеги продемонстрировали, что с помощью «перепрограммирующих факторов» *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* и *c-Myc* можно даже соматические клетки от 82-летнего донора перепрограммировать в индуцированные плюрипотентные стволовые (iPS) клетки [6,7]. Важно отметить, что стареющие фибробласты пожилых доноров можно вернуть в состояние iPS клеток путем введения «перепрограммирующих факторов», а затем с помощью повторной дифференцировки превратить обратно в фибробласты, которые утратили признаки старения и приобрели признаки молодых фибробластов [8]. Одним словом, получение iPS клеток, также, как и эмбриональных стволовых клеток, полученных с помощью пересадки ядра (NT-

ES, nuclear transfer embryonic stem cell), способно «обнулить» процесс старения клетки (Рис. 1).

Оба метода могут обратить вспять молекулярные признаки старения [9,10]. Так, например, укорочение теломера обращается вспять в iPS клетках: после индукции теломеразы удлиняет теломеры [11]. Теломеры также удлиняются в ядрах клонированных эмбрионов [12], хотя механизм в этом случае, вероятно, более сложный, поскольку использует и теломеразу и сестринский хроматидный обмен теломерами [13]. Помимо этого, в iPS клетках снижается уровень повреждения ДНК [14] и улучшаются функции митохондрий [15]. Клетки, полученные в результате дифференцировки iPS клеток, теряют экспрессию маркеров старения и приобретают профиль экспрессии генов, свойственный молодым клеткам [8].

Приведенные выше методы, использованные для демонстрации обратимости процесса старения, основаны на повторной дифференцировке эмбриональных стволовых клеток или клеток, полученных из них. Судя по этим данным, может показаться, что омоложение требует прохождения через эмбриональную стадию. Примечательно, что эмбриональные стволовые клетки и их дифференцированные производные являются основой для регенеративной медицины, даже несмотря на убедительные недостатки их применения [16]. Одним из наиболее серьезных недостатков является развитие тератом при экспрессии «факторов перепрограммирования» *in vivo* [17,18]. Для преодоления этой проблемы, был предложен новый подход, называемый «перепрограммирование возраста», который обходит характерные для SCNT и iPS технологий цикл повторного дифференцирования (Рисунок 1).

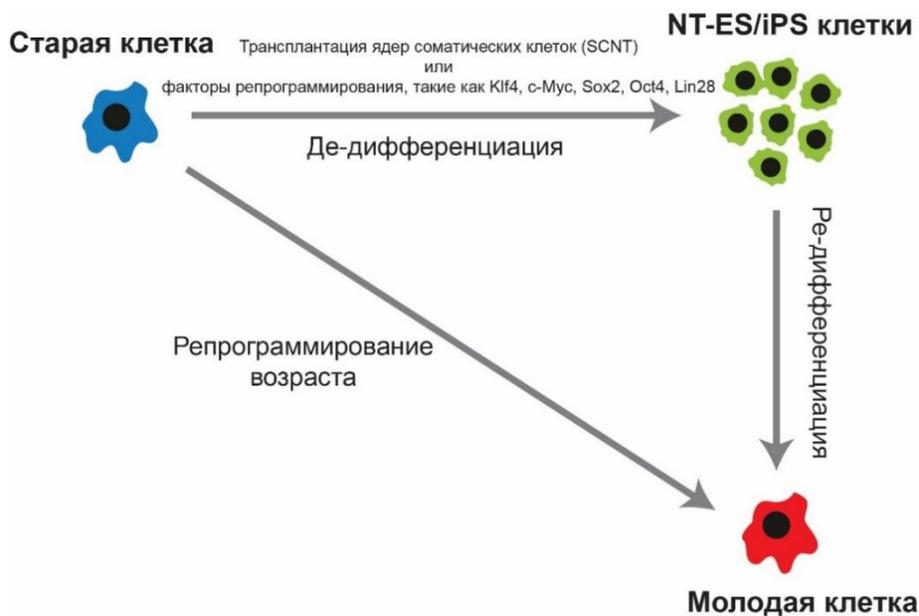


Рисунок 1 - «Перепрограммирование зрелой клетки» напрямую без прохождения промежуточной стадии де-дифференцировки и повторной дифференцировки, характерной для методов SCNT и iPS. Пересадка ядра соматической клетки и ввод «факторов перепрограммирования» возвращают зрелую клетку в состояние эмбриональной стволовой клетки (клетки NT-ES и iPS, соответственно). После этого полученные стволовые клетки могут быть повторно дифференцированы в омоложенные соматические клетки. По сравнению с SCNT и iPS, «перепрограммирование возраста клеток» не проходит эмбриональную стадию (взято с изменениями из [19]).

1. Перепрограммирование возраста клетки и эпигенетическое омоложение

На первый взгляд, перепрограммирование ядра, наблюдаемое при SCNT или генерации iPS клеток кажется цельным процессом - «перепрограммирование развития клетки» в эмбриональное, плюрипотентное состояние сопровождается «перепрограммированием возраста клетки», которое обнуляет возраст донорского ядра (Вставка 1). Это является существенным препятствием, потому что для того, чтобы омолодить старые клетки без де-дифференцировки, необходимо, чтобы перепрограммирование способности к развитию было отделено от перепрограммирования возраста клетки [19–21]. Иными словами, можно ли омолодить стареющие клетки без прохождения эмбриональной стадии?

Терминология перепрограммирования.

Ядерное перепрограммирование – это процесс, посредством которого дифференцированная клетка вновь приобретает способность к развитию и возрастной потенциал.

Перепрограммирование развития – это процесс, посредством которого дифференцированная клетка вновь приобретает способность к развитию.

Перепрограммирование возраста – это процесс, посредством которого дифференцированная клетка вновь приобретает возрастной потенциал.

Эпигенетическое омоложение является одним из аспектов перепрограммирования возраста и представляет собой процесс, посредством которого пожилой эпигенотип перепрограммируется в молодой эпигенотип.

Для этого был предложен экспериментальный подход, с помощью которого можно было бы проверить, можно ли разделить эти два процесса [20]. Факторы перепрограммирования iPS клеток должны быть введены в стареющие клетки с ранее охарактеризованными маркерами старения. При

продвижении от стареющей клетки к iPS клетке, должна быть найдена стадия, на которой маркеры старения полностью были утрачены или проявлялись бы в значительно меньшей степени (что свидетельствовало бы об их омоложении), в то время как «частично перепрограммированные» клетки все еще проявляли бы свой специализированный фенотип, то есть у клеток не проявлялись бы признаки де-дифференцировки (см. Рисунок 2А в [20]). Такие частично перепрограммированные клетки оказались бы омоложенными в аспекте старения и тем самым представили бы доказательство того, что процессы перепрограммирования развития и возраста действительно могут быть разделены.

В первых экспериментальных тестах были использованы стареющие человеческие диплоидные фибробласты (HDF – human diploid fibroblasts) в сочетании с методом анализа индивидуальных iPS клеток для измерения динамики важнейшего эпигенетического модификатора – HP1 β , в стареющих клетках до и после начала их превращения в iPS клетки [22]. Выбор эпигенетического маркера для оценки степени омоложения основывался на том, что эпигенетические изменения являются одной из отличительных черт старения [9,23,24]. Были предприняты меры, чтобы исключить де-дифференцировку путем поддержания клеток на среде для культивирования фибробластов, а не в среде для стволовых клеток, которая необходима для генерации iPS клеток. В результате было показано, что подвижность HP1 β была обновлена на 9 день после введения факторов перепрограммирования, хотя этот признак омоложения оказался временным (Рисунок 2А). Тем не менее, «эпигенетическое омоложение» (Вставка 1) подвижности HP1 β подтвердило, что перепрограммирование возраста

клетки может быть произведено без сопутствующего перепрограммирования развития клетки.

Временное эпигенетическое омоложение HP1β свидетельствует о том, что возрастные эпигенетические изменения могут быть обращены вспять в отсутствие де-дифференцировки. Из описанных возрастных изменений наиболее известным является метилирование ДНК и, в частности, недавно обнаруженные «эпигенетические часы», которые могут измерять eAge [23]. Теперь мы переходим к эпигенетическим часам и eAge, так как недавнее исследование показывает, что eAge обеспечивает надежное измерение степени эпигенетического омоложения, которое происходит во время перепрограммирования возраста.

Перепрограммирование eAge

Связь метилирования ДНК со старением давно и хорошо изучена [25–31]. В настоящее время эта связь имеет прочную статистическую основу благодаря разработке «эпигенетических часов» на основе уровня метилирования цитозинов в 353 CpG-областях в геноме человека [23] (вставка 2).

Эпигенетические часы могут быть использованы для определения эпигенетического возраста eAge различных тканей и имеют поразительно точную корреляцию с хронологическим возрастом ($r = 0,96$) со средней погрешностью 3,6 года [23,32–34]. Точность этого метода выше, чем у других биологических маркеров, таких как длина теломер [35], и все указывает на то, что eAge может быть мерой биологического возраста. В данном контексте фундаментальное исследование показало, что eAge эмбриональных стволовых клеток и iPS-клеток равен нулю [23] (вставка 2). Это подтверждает, что eAge был перепрограммирован, т.к. эпигенетический возраст eAge iPS клеток был значительно меньше, чем у клеток, из которых они были получены. Однако вопрос о том, можно ли отделить перепрограммирование eAge от перепрограммирования на этапе развития, приводящего к получению iPS-клеткам, оставался открытым.

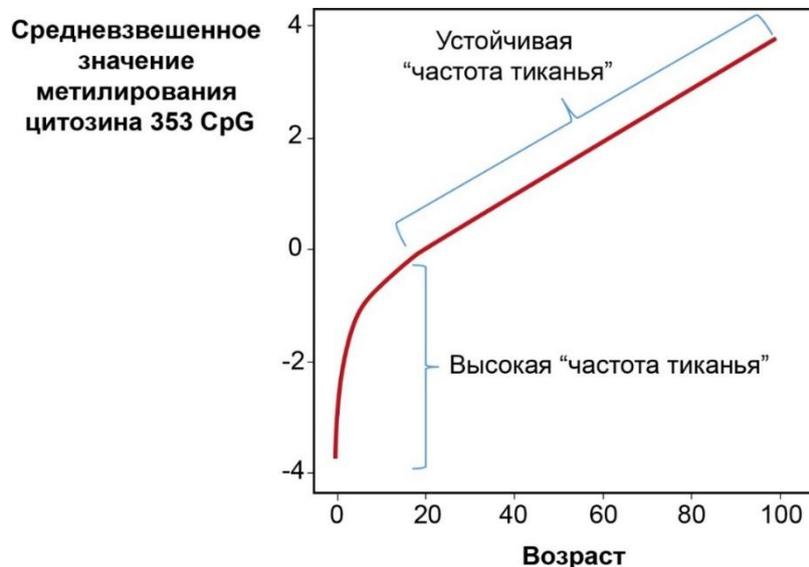


Рисунок 2 - «Эпигенетические часы» и eAge

Хорват [23] разработал «эпигенетические часы», основанные на возрастных изменениях в метилировании ДНК в 353 «часовых» CpG-областях в геноме человека. Метилирование в этих CpG-областях происходит не в одинаковом направлении; метилирование 193 из 353 CpG увеличивается с возрастом, в то время как остальные 160 CpG уменьшаются с возрастом. Если графически обозначить средневзвешенное значение метилирования цитозина по всем 353 CpG областям на ординате и хронологический возраст на абсциссе, получается кривая, которая представляет собой «эпигенетические часы». Отличительной особенностью скорости изменения кривой является то, что эпигенетические часы имеют высокую частоту тиканья до зрелого возраста (~ 20 лет), после чего они замедляются до постоянной, устойчивой, частоты тиканья. Используя эти эпигенетические часы, можно предсказать возраст (или эпигенетический возраст, eAge) различных тканей с медианной погрешностью 3,6 года. Возраст эмбриональных стволовых клеток и iPS-клеток равен нулю [36]. Важным аспектом является возможность

перепрограммирования возраста eAge, то есть омоложение без де-дифференцировки ([37]; рисунок 2А). Изменено на основе рисунка 6В в [23]. Ответ на этот вопрос был получен недавно, в результате исследования эпигенетического омоложения подвижности HP1β [22]. Олова и соавторы [37] провели анализ *in silico* ранее опубликованных данных 49-дневного мониторинга iPS перепрограммирования человеческих фибробластов [38]. Этот анализ показал, что перепрограммирование eAge действительно может быть отделено от перепрограммирования развития. Они наблюдали уменьшение eAge после того, как перепрограммирующие факторы были введены в фибробласты человека (eAge ~ 65 лет), которое началось на 3-7 день. После этого стабильное снижение eAge отмечалось на уровне 3,8 года в день, и достигло нулевой отметки к 20-му дню (Рисунок 2В). Примечательно, что снижение eAge началось задолго до самой ранней волны экспрессии генов плюрипотентности. Экспрессия генов, специфических для фибробластов показала более сложную картину: два из трех кластеров генов фибробластов

демонстрировали быстрое снижение, которое достигло плато с 7-го по 15-й день. К этому времени произошло значительное снижение eAge. На 35-й день окончательно исчезла экспрессия генов фибробластов и ознаменовала тем самым потерю дифференцировки. К тому времени eAge был равен нулю уже на протяжении 15 дней. Таким образом, по-видимому, перепрограммирование возраста клетки, измеряемое с помощью eAge, отделимо от

перепрограммирования развития (потеря соматической идентичности) (Рисунок 2С). Снижение eAge в режиме 3,8 года/день удивляет своей равномерностью. Предсказуемое снижение eAge может предоставить механизм для выбора его оптимального значения, с помощью таких параметров, как время начала экспрессии факторов перепрограммирования iPS клеток, продолжительность и уровень их экспрессии.

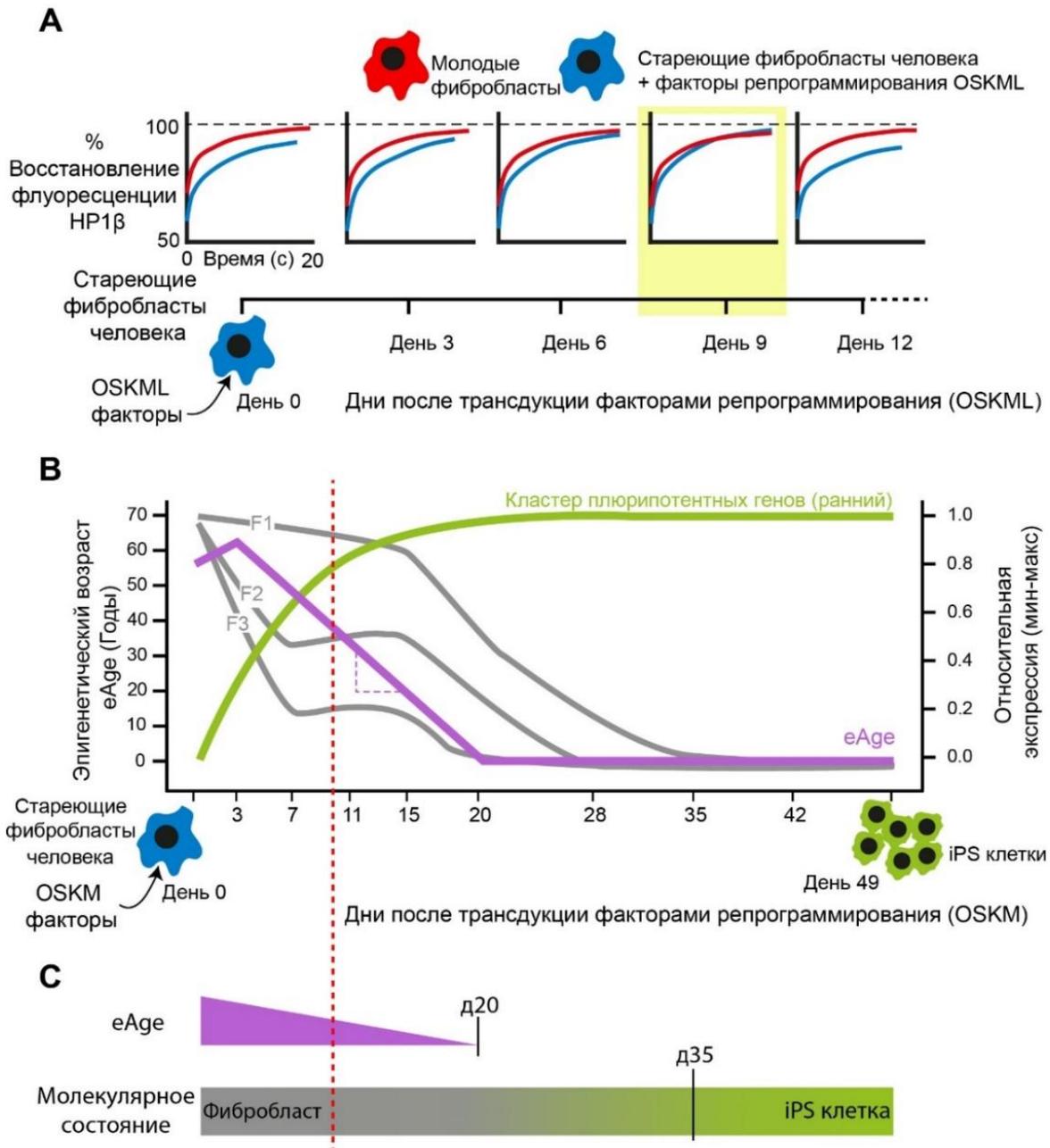


Рисунок 2 - Перепрограммирование возраста с использованием факторов перепрограммирования iPS.

А. Схематическое изображение эксперимента, выполненного Манукян и Сингх [22]. Анализ флуоресценции после выгорания флуоресцентного сигнала (FRAP) показал, что подвижность эпигенетического модификатора HP1β в стареющих фибробластах человека (показано синим цветом), трансдуцированных факторами перепрограммирования (OSKML), достигала уровней, обнаруженных в молодых фибробластах (показано красным цветом) на 9-й день после трансдукции

(выделено желтым цветом). Эпигенетическое омоложение подвижности HP1β является кратковременным и возвращается к уровню, обнаруженному в зрелых клетках на 12-й день.

В. Схематическое изображение анализа *in silico* выполненного Оловой и соавторами [37]. Между 3 и 7 днем после трансдукции человеческих фибробластов (eAge ~ 65 лет) факторами перепрограммирования OSKM, эпигенетический возраст eAge (показан фиолетовой линией) снижается с постоянной

скоростью 3,8 года в день (показано фиолетовой пунктирной линией) и достигает нуля на 20-й день. Анализ экспрессии трех кластеров генов, специфических для фибробластов F1, F2 и F3 (показано серым цветом), показал, что два кластера (F2 и F3) проявляли быстрое снижение, а затем их экспрессия стабилизировалась в промежутке с 7 по 15 день. Кластер F1 оставался стабильным в течение 15 дней. Красная пунктирная линия проходит через 10-й день, период, когда наблюдается значительное уменьшение eAge, которое продолжает падать, в то время как уровни экспрессии F1, F2 и F3 достигают плато. После 15 дней экспрессия всех трех кластеров снизилась с полным угасанием кластера F1 на 35-й день. Увеличение экспрессии кластера плюрипотентных генов (обозначено зеленым цветом) показало, что они достигают установившихся уровней только после достижения eAge=0. Гены в кластере генов ранней плюрипотентности и кластерах специфических для фибробластов генов F1, F2 и F3 перечислены в таблице 1 в [37].

С. Схема, показывающая, что кинетика eAge и перепрограммирования развития различны [37]. Перепрограммирование eAge упало до нуля к 20-му дню. Экспрессия гена фибробластов, отмечающая потерю дифференцированного состояния, пропадает к 35 дню, после чего устанавливается молекулярное состояние iPS-клеток. Красная пунктирная линия соответствует тому, что описано на Рисунке 1В.

Перепрограммирование возраста *in vivo*.

Временное эпигенетическое омоложение подвижности NP1 β было следствием однократного воздействия факторами перепрограммирования (Рис. 2А). В последнее время был сделан значительный шаг вперед при использовании циклической экспрессии факторов перепрограммирования [39]. Такие условия привели к «частичному перепрограммированию» клеток, у которых присутствовали заметные признаки омоложения как *in vitro*, так и, что более важно, *in vivo* (Рис. 3).

В первоначальных исследованиях *in vitro* экспрессию перепрограммирующих факторов OSKM проводили короткими циклами (от 2 до 4 дней) в фибробластах мышей с прогерией (LAKI progeria mice) – несущих мутацию в гене, кодирующем белок Ламин А (Lamin A, *Lmna*). Эта мутация приводит к быстрому старению организма, и мыши с проявлением преждевременного фенотипа старения получили название LAKI [40]. Кратковременная экспрессия факторов перепрограммирования OSKM привела к эпигенетическому омоложению двух гетерохроматин-специфических маркеров - H3K9me3 и H4K20me3 (гистоны H3 и H4, триметилированные по лизинам 9 и 20 соответственно) (Рис. 3; [39]). Помимо

этого, наблюдалась потеря трех других признаков старения: (i) восстановление функции митохондрий, проявляющееся как снижение уровня активных форм кислорода, (ii) снижение уровня повреждения ДНК, определяемое по уровню белка 53BP1 и фосфорилированной формы гистона гамма-H2AX, и (iii) снижение уровня маркеров стареющих клеток, измеряемое по уровню экспрессии металлопротеазы MMP13, белка *Il-6* и фермента β -галактозидазы (Рис. 3). Кроме того, наблюдалось восстановление реакции на стресс, оцененной на примере р53-опосредованного противоопухолевого каскада. Аналогичные результаты наблюдались на культивируемых нормальных фибробластах грызунов и человека на поздних пассажах, что указывало на то, что эффективность экспрессии короткими циклами не ограничивается перепрограммированием возраста клеток у мышей с прогерией.

Было сделано два вывода на основе исследований фибробластов мышей LAKI после прекращения в них экспрессии факторов перепрограммирования OSKM. Во-первых, было показано, что признаки клеточного старения вновь проявляются, но их можно обратить вспять, если повторно провести индукцию экспрессии OSKM факторов. Циклическая экспрессия OSKM поддерживала обращение вспять возрастных фенотипов. Во-вторых, эпигенетические изменения являются вероятной причиной старения, по крайней мере, *in vitro*, поскольку введение ингибитора гистона лизинметилтрансферазы – хетогина устраняет эффект циклической экспрессии в фибробластах LAKI. Циклический режим экспрессии OSKM был далее использован *in vivo* с экспрессией в течение 2 дней и без экспрессии в течение 5 дней. Этот цикл можно повторять неограниченное количество раз. Применение циклической экспрессии OSKM факторов у мышей LAKI имело поразительный эффект. Помимо восстановления признаков, связанных со старением, наблюдалось значительное увеличение медианной и максимальной продолжительности жизни ([39]; Рис. 3). У стареющих мышей дикого типа циклическая экспрессия факторов перепрограммирования усиливала регенеративную способность β -клеток поджелудочной железы и клеток-сателлитов скелетных мышц после химического повреждения (Рис. 3). Рост тератом или увеличение смертности в условия *in vivo* не наблюдались. «Частичное перепрограммирование» не привело ни к потере маркеров дифференцировки тканей, ни к появлению такого маркера плюрипотентности как Nanog, что свидетельствовало о возможности перепрограммирования возраста *in vivo* без процесса перепрограммирования развития.

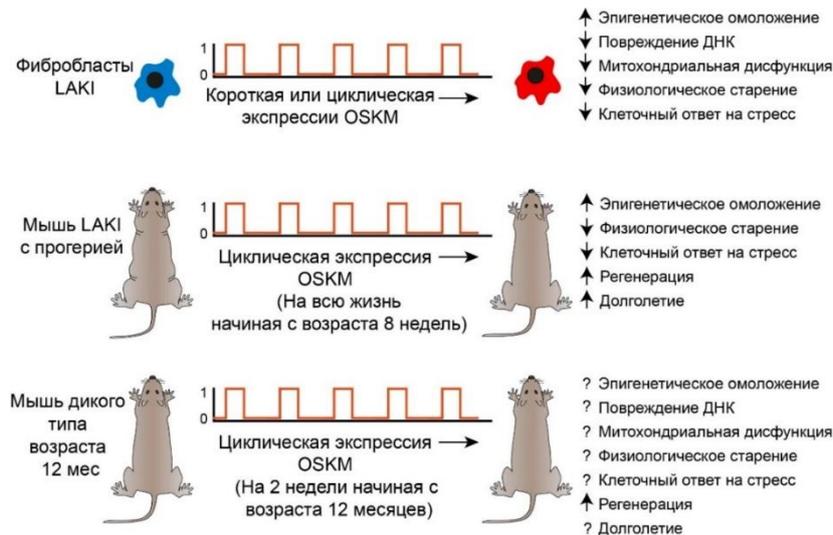


Рисунок 3 - Перепрограммирование возраста *in vivo*. Схема эксперимента, проведенного Окампо и его коллегами в 2016 году [39]

Верхний ряд: Экспрессия факторов перепрограммирования OSKM короткими или двухдневными циклами с пятидневным перерывом в фибробластах мышей линии LAK1 с прогерией (показано синим цветом) приводит к эпигенетическому омоложению, снижению уровня повреждения ДНК, уровня маркеров клеточного старения, митохондриальной дисфункции и клеточного ответа на стресс. Первые четыре характеристики являются известными маркерами старения [9]. Фибробласты полученные из мышей LAK1 с прогерией с использованием перепрограммирования возраста, отмечены на схеме красным цветом. Аналогичные результаты были получены и у фибробластов стареющих мышей дикого типа и человека.

Средний ряд: Циклическая экспрессия факторов перепрограммирования в клетках мышей LAK1 с прогерией вызывает снижение уровня повреждения ДНК, признаков старения, клеточного ответа на стресс и приводит к эпигенетическому омоложению. У таких мышей также наблюдалось обновление клеток-сателлитов в мышцах после химического повреждения. Помимо этого, увеличивалась медианная и максимальная продолжительность жизни мышей.

Нижний ряд: Циклическая экспрессия факторов перепрограммирования OSKM у мышей дикого типа возрастом 12 месяцев вызывала регенерацию β -клеток в поджелудочной железе и клеток-сателлитов мышц после химического повреждения. Остальные параметры в этом эксперименте не исследовались, поэтому отмечены на схеме вопросительными знаками. Стрелка вверх означает увеличение, а стрелка вниз – уменьшение того или иного параметра в результате циклической экспрессии факторов перепрограммирования OSKM.

2. Основные вопросы касательно перепрограммирования возраста

В исследованиях *in silico* [37,41] подробно исследуется тема перепрограммирования возраста *in vitro* и поднимаются три разных вопроса. Во-первых, имеют ли другие признаки старения схожую с перепрограммированием eAge кинетику? Во-вторых, существует ли «критическая зона», в которой перепрограммирование возрастных признаков имеет

оптимальное отделение от перепрограммирования развития? Идентификация такой зоны позволила бы разработать оптимизированные для перепрограммирования возраста режимы без дифференцировки, которая в свою очередь может увеличить риск тератом, образуемые из-за неограниченной экспрессии факторов перепрограммирования *in vivo* [17,18,42]. Наконец, третий вопрос – является ли кинетика перепрограммирования возраста одинаковой для всех типов клеток? Если нет, то время, продолжительность и уровни факторов перепрограммирования должны быть адаптированы для разных типов клеток, особенно *in vivo*, чтобы обеспечить эффективное перепрограммирование возраста.

Частичный ответ на первый вопрос был получен в результате экспериментов *in silico* [37]. Данные экспериментов показали, что маркер старения, такой как белок-ингибитор клеточного цикла p21^{CDP1} (CDKN1A), продемонстрировал повышение экспрессии, а также достиг плато в промежутке с 7 по 15 день (Рис. 4А). Данный профиль экспрессии совпадал с тремя кластерами экспрессии генов специфичных для фибробластов (Рис. 4А). По прошествии 15 дней уровень экспрессии маркеров старения снизился достигая минимума примерно в то же время, когда происходит потеря дифференцировки. Данный результат может стать положительным для перепрограммирования возраста, поскольку известно, что экспрессия p21 блокирует индукцию iPS клеток [43]. Тем самым задерживая потерю дифференцировки, но при этом не влияя на устойчивое снижение эпигенетического возраста eAge [37]. Как следствие, увеличение продолжительности экспрессии p21 после ввода факторов перепрограммирования iPS может усилить эффект перепрограммирования возраста остальных признаков старения. Однако увеличение продолжительности экспрессии ингибиторов клеточного цикла будет препятствовать росту клеток, необходимых для создания популяции клеток для трансплантации.

Основополагающим принципом метода перепрограммирования возраста является его многоуровневость, что подразумевает собой

возможность регулирования на каждом уровне независимо друг от друга [44]. Известно, что при отсутствии белка p21 старения можно избежать. При этом дифференцированный фенотип человеческих фибробластов остается неизменным [45]. Тем самым, это позволит генерировать большое количество клеток после перепрограммирования возраста. Таким образом, сочетание регулируемой экспрессии iPS факторов перепрограммирования с контролируемой манипуляцией белков-ингибиторов клеточного цикла даст возможность увеличить число перепрограммированных старых клеток в условиях *in vitro*.

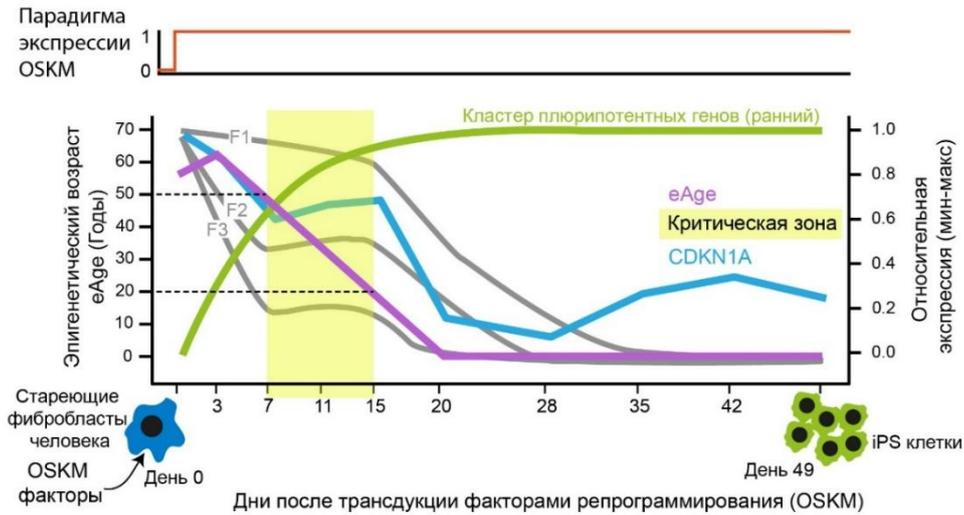
Чтобы определить «критическую зону» для оптимального перепрограммирования возраста, мы применили подход, описав сначала потенциальные контуры «критического окна», в котором происходит перепрограммирование возраста. «Критическая зона» может представлять собой период с 7-го по 15-й день после введения iPS факторов перепрограммирования в фибробластах человека [46]. Существуют три доказательства, поддерживающие это утверждение. Во-первых, дни 7-15 пересекаются с плато в фибробласт-специфической экспрессии, в то время как происходит равномерное снижение eAge (Рис. 4А; [37]). Во-вторых, эпигенетическое омоложение подвижности HP1 β происходит в этой зоне на 9-й день [22]. В-третьих, изучение индукции iPS-клеток выявило фазы «эпигенетической нестабильности» или так называемых «неопределенных состояний», находящиеся между дифференцированным фенотипом и фенотипом эмбриональных стволовых клеток, которые длятся примерно от 7 до 15 дней после введения факторов перепрограммирования iPS-клеток [19,47,48]. Крайние точки «критической зоны» соответствуют возрасту eAge 50 (7-й день) и 20 (15-й день) (выделено желтой полосой на Рис. 4А). Стоит отметить, что 15-й день близок к eAge ~ 20, ниже которого эпигенетические часы «тикают» быстрее [23]. Соответственно, из-за увеличения скорости, когда значение eAge опускается ниже критической зоны (eAge ~ 20), есть высокая вероятность необратимого коллапса eAge до нуля, что является характерным для полностью дифференцированных iPS-клеток [23]. Достижение нулевой точки вероятно способствует прохождению клеток через «точку невозвращения» к состоянию плюрипотентных стволовых клеток [48].

В связи с этим, мы предполагаем, что альтернативная парадигма циклической экспрессии перепрограммирующих факторов iPS [39] может быть использована для отсрочки де-дифференцирования и продлить период, в котором может выполняться перепрограммирование возраста. Экспериментально это может быть достигнуто путем поддержания eAge

выше или внутри «критической зоны», которая находится между eAge 50 и 20 (желтая полоса на Рисунке 4В).

Прямые экспериментальные доказательства специфических различий в типе клеток в кинетике возрастного перепрограммирования отсутствуют. Некоторые косвенные доказательства могут быть найдены в исследовании «прерванного перепрограммирования», в котором использовалась докс-индуцированная система для индукции клеток-предшественников (iPL) из клеток Клара из легких (клетки Club-iPL [49]). Следует проявлять осторожность при интерпретации этих данных, т.к. на настоящий момент не были проведены измерения eAge клеток Club и полученных из них докс-индуцированных клеток Club-iPL. Прерванное перепрограммирование занимает недели для генерации клеток Club-iPL, тогда как перепрограммирование возраста фибробластов человека измеряется в днях (Рисунок 4А). Это указывает на возможность существования связи между типом клеток и кинетикой перепрограммирования возраста. Нативные клетки Club имеют ограниченную пролиферативную способность и поэтому мало пригодны в экспериментах по трансплантации. Напротив, клетки Club-iPL продуцируются в больших количествах после трехнедельной экспрессии факторов перепрограммирования iPS, что представляет собой продолжительный период, близкий к четырем неделям, необходимый для индукции генов, связанных с iPS (например, Nanog; [49]). Клетки Club-iPL не похожи ни на какие известные предшественники, но как только экспрессия факторов перепрограммирования прекращается, клетки Club-iPL становятся фенотипически идентичными нативным клеткам Club и могут быть использованы для экспериментов по приживлению на модели мышинного муковисцидоза. В совокупности, эти данные указывают на то, что клетки Club-iPL могут быть уникальным типом клеток, индукция которых требует некоторой степени де-дифференцировки. Было высказано предположение, что ограниченная де-дифференцировка может потребоваться для перепрограммирования возраста [19,20], особенно в клетках, невосприимчивым перепрограммированию возраста. Главное, чтобы после прекращения перепрограммирования функции специализированных клеток были сохранены. Степень, в которой клетка может быть де-дифференцирована, при этом все еще будучи способной вернуться к своему первоначальному фенотипу, также может зависеть от типа клетки (Рисунок 5).

A



B

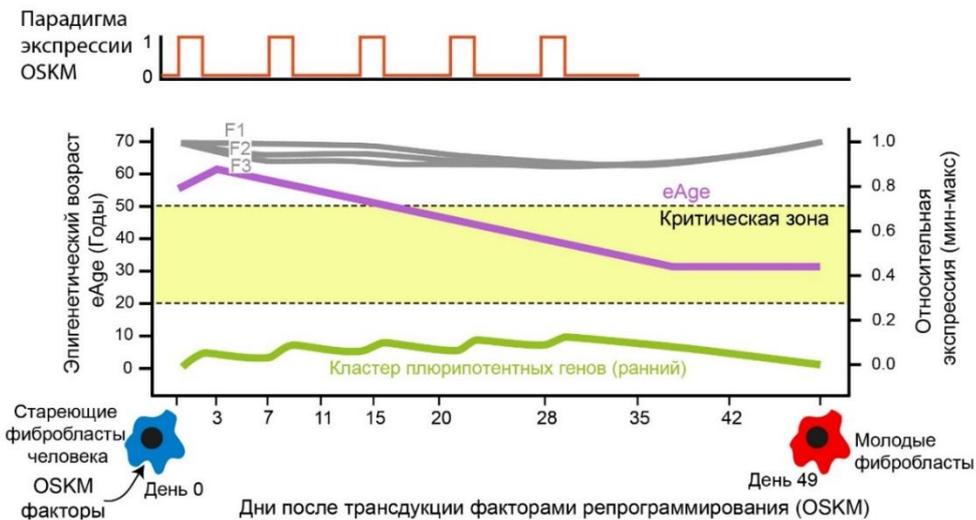


Рисунок 4 - Сохранение eAge в пределах «критической зоны» задерживает де-дифференцировку, тем самым препятствуя перепрограммированию развития и расширяет область, благоприятную для перепрограммирования возраста

A. Традиционная концепция получения iPS клеток характеризуется экзогенной экспрессией факторов перепрограммирования OSKM после трансдукции с помощью вируса. Экзогенная экспрессия окончательно переходит в эндогенную экспрессию OSKM после того, как клетки переводят в среду эмбриональных стволовых клеток. На рисунке показаны профили экспрессии трех кластеров фибробласт специфичных генов (F1, F2 и F3), белка-ингибитора клеточного цикла p21 (CDKN1A) и начальная волна профиля экспрессии генов плюрипотентности. Профили экспрессии F1-F3 и p21 (CDKN1A) выходят на плато в промежутке с 7 по 15 день, который мы назвали «критическая зона». Эта зона выделена желтым цветом на рисунке. Ее границы проходят через отметки эпигенетического возраста eAge от 50 до 20 (пунктирная линия) (взято с изменениями из [44]).

B. Концепция циклической экспрессии iPS [39] характеризуется всплесками экспрессии генов

факторов перепрограммирования iPS и продолжительными периодами когда экспрессия iPS прекращена. В условиях такой модели циклическая экспрессия генов iPS факторов экспрессии генов приводит к плавному понижению эпигенетического возраста eAge в пределах «критической зоны». По сравнению с Рисунком 1A в группе ранних генов плюрипотентности наблюдается низкий уровень экспрессии, в то время как в группах генов F1-F3 фибробластов уровень остается повышенным. В таком случае де-дифференцировка приостанавливается, что дает более продолжительный интервал времени, в пределах которого может происходить перепрограммирование возраста. Применяя такой подход к мышам с прогерией, удалось перепрограммировать следующие 4 признака старения: эпигенетические модификации, клеточное старение, повреждения ДНК и митохондриальную дисфункцию [39].

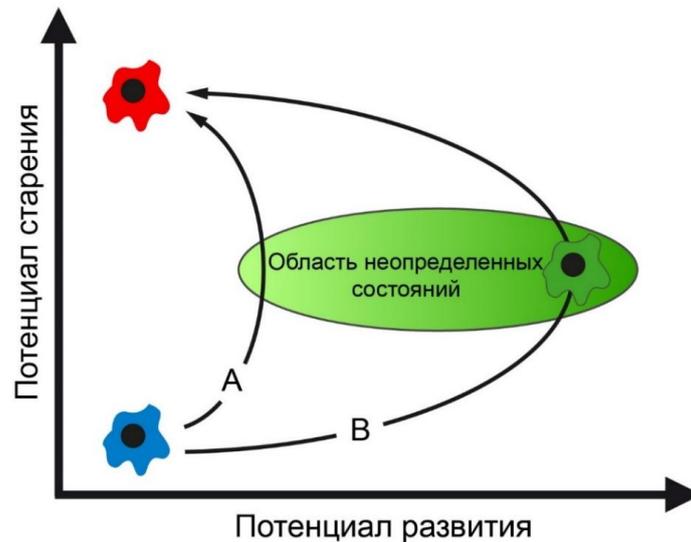


Рисунок 5 - Кинетика перепрограммирования возраста может зависеть от типа клеток и иметь ограниченную степень де-дифференцировки.

(А) Факторы перепрограммирования iPS (OSKM) вводятся в старую клетку (показано синим цветом), которая проходит короткий путь через зону нестабильности, пересекаясь с так называемой областью «неопределенных состояний» [48]. Старая клетка проходит через перепрограммирование возраста и вновь приобретает потенциал старения (клетка красного цвета). Выбрав короткий путь, клетка не подвергается де-дифференцировке и сохраняет свои специализированные функции на протяжении всего процесса.

(В) Старая клетка (показано синим цветом) другого типа клеток проходит более длинный путь через зону нестабильности, потому что кинетика перепрограммирования возраста для этого типа клеток идет медленнее. Также может потребоваться ограниченная степень де-дифференцировки (показано зеленым цветом), но клетка вернется к своему специализированному фенотипу (показано

красным цветом) после выключения факторов перепрограммирования. Примером может служить перепрограммирование возраста клеток Club по более длинному пути и прохождении через де-дифференцированное состояние, представленное клетками Club-iPL [49]. Взято и модифицировано из [19].

ВЫВОДЫ: Перепрограммирование ядра с помощью технологий SCNT и iPS в настоящее время воспринимается как непрерывный процесс, посредством которого специализированная клетка вновь приобретает потенциал развития и старения [50,51] (Вставка 1). Возможно, потребуется пересмотреть данную точку зрения в связи с наличием доказательств того, что перепрограммирование ядра является многослойным процессом и составляющие его компоненты могут быть разделены экспериментально (Рисунок 6).



Рисунок 6 - Перепрограммирование ядра как многостадийный процесс.

Перепрограммирование ядра можно разделить на два процесса: в первом перепрограммируют возраст клетки, во втором - развитие клетки. Процесс перепрограммирования зрелых клеток имеет несколько составляющих, главными из которых являются 9 признаков старения [9]. Жирным шрифтом выделены те признаки, которые были успешно перепрограммированы экспериментально. К

ним относятся эпигенетическое омоложение [22,37,39], повреждение ДНК [39], клеточное старение [39] и митохондриальная дисфункция [39]. Остается рассмотреть, могут ли другие признаки (выделено серым цветом) перепрограммироваться в зрелом состоянии клетки без перепрограммирования развития. Перепрограммирование развития также изображено многослойным процессом, состоящим из

множества различных путей развития (от 1 до n), которые могут быть перепрограммированы независимо друг от друга. По сути, многоуровневая природа перепрограммирования ядер отражает ограничения потенциала развития и старения, наблюдаемое при переходе от состояния яйца к взрослому и старому состоянию: каждое ограничение должно быть перепрограммировано для повторного приобретения ядром того потенциала, который когда-то был ему присущ.

Существуют значительные доказательства в поддержку разделения перепрограммирования ядра на перепрограммирование возраста и развития, как и первоначально предполагалось [20,52–55,46,56–61]. В частности, динамика перепрограммирования возраста и развития показывает, что их кинетика весьма различается. Измерения с помощью eAge показали, что перепрограммирование возраста завершается задолго до потери соматической идентичности, которая возникает в результате перепрограммирования развития (Рис. 2В и С). Кроме того, молекулярные признаки старения могут быть перепрограммированы по возрасту (омоложение без де-дифференцировки; Вставка 1), как наблюдалось при эпигенетическом омоложении [22,37,39], уменьшении повреждения ДНК и клеточного старения [39] и уменьшении дисфункции митохондрий [39] (Рис. 2 и 3). Будущие исследования определят возможность омоложения других признаков старения. Тем самым перепрограммирование возраста сможет стать независимым и экспериментально отделимым от перепрограммирования развития. Также будет весьма интересно узнать могут ли признаки старения быть перепрограммированы независимо друг от друга.

Перепрограммирование возраста имеет ряд преимуществ перед современной регенеративной терапией [19], в том числе и прямое перепрограммирование, при котором происходит транс-дифференцировка фибробластов в клетки другого типа без прохождения через эмбриональную стадию и репрограммирования признаков старения [62,63]. Иными словами, перепрограммирование возраста позволяет генерировать омоложенные клетки для регенеративной терапии без прохождения цикла повторной дифференцировки [19] и даже использовать данные технологии в исследованиях по регенерации [64–66]. Тем не менее, требуется некоторое время до того момента пока перепрограммирование возраста можно рассматривать как жизнеспособную альтернативу разрабатываемых в настоящее время клеточным терапиям iPS и NT-ES. Исследования по «прерванному перепрограммированию» показали перспективу в использовании заместительной клеточной терапии у мышей, хотя степень омоложения приживленных клеток не была определена [49] (Рис. 5). Исследование с использованием мезенхимальных стромальных клеток (МСК) показало, что прерванное перепрограммирование не омолаживает МСК, хотя среди предостережений этого исследования была указана *inter alia*, неконтролируемая гетерогенная экспрессия факторов перепрограммирования из эписомальных векторов [67]. Перепрограммирование возраста *in vivo*, скорее всего, будет обусловлено разработкой эффективных методов доставки факторов перепрограммирования в места травм или

заболеваний. Небольшие молекулы, которые могут заменить классические продукты генов перепрограммирования [68–70], будут в авангарде исследований *in vivo* из-за свободного пересечения клеточных мембран. Адаптация химической природы, времени и количества факторов перепрограммирования также может добавить дополнительное преимущество, заключающееся в том, чтобы избежать развития тератом, которые могут возникнуть в результате неограниченной экспрессии классических факторов перепрограммирования iPS *in vivo* [17,18]. Все это цели на будущее. С таким темпом развития исследований, пройдет немного времени, прежде чем появятся признаки того, что они могут быть достигнуты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 38, 455–463. 10.1073/pnas.38.5.455.
- 2 Gurdon, J.B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology* 4, 256–273. 10.1016/0012-1606(62)90043-X.
- 3 Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813. 10.1038/385810a0.
- 4 Mizutani, E., Ono, T., Li, C., Maki-Suetsugu, R., and Wakayama, T. (2008). Propagation of senescent mice using nuclear transfer embryonic stem cell lines. *genesis* 46, 478–483. 10.1002/dvg.20420.
- 5 Wakayama, S., Mizutani, E., and Wakayama, T. (2010). Production of Cloned Mice from Somatic Cells, ES Cells, and Frozen Bodies. In *Methods in Enzymology* (Elsevier), pp. 151–169. 10.1016/S0076-6879(10)76009-2.
- 6 Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., *et al.* (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science* 321, 1218–1221. 10.1126/science.1158799.
- 7 Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- 8 Lapasset, L., Milhavel, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ait-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., *et al.* (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* 25, 2248–2253. 10.1101/gad.173922.111.
- 9 López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217. 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- 10 López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186, 243–278. 10.1016/j.cell.2022.11.001.
- 11 Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 4, 141–154. 10.1016/j.stem.2008.12.010.
- 12 Schaezlein, S., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Kues, W.A., Dorsch, M., Manns, M.P., Niemann, H., and Rudolph, K.L. (2004). Telomere length is reset during early mammalian

- embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 8034–8038. 10.1073/pnas.0402400101.
- 13 Liu, L., Bailey, S.M., Okuka, M., Muñoz, P., Li, C., Zhou, L., Wu, C., Czerwiec, E., Sandler, L., Seyfang, A., *et al.* (2007). Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* *9*, 1436–1441. 10.1038/ncb1664.
- 14 Marión, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* *460*, 1149–1153. 10.1038/nature08287.
- 15 Suhr, S.T., Chang, E.A., Tjong, J., Alcasid, N., Perkins, G.A., Goissis, M.D., Ellisman, M.H., Perez, G.I., and Cibelli, J.B. (2010). Mitochondrial Rejuvenation After Induced Pluripotency. *PLoS ONE* *5*, e14095. 10.1371/journal.pone.0014095.
- 16 Herberts, C.A., Kwa, M.S., and Hermesen, H.P. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med* *9*, 29. 10.1186/1479-5876-9-29.
- 17 Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., *et al.* (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* *502*, 340–345. 10.1038/nature12586.
- 18 Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., *et al.* (2014). Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. *Cell* *156*, 663–677. 10.1016/j.cell.2014.01.005.
- 19 Manukyan, M., and Singh, P.B. (2012). Epigenetic rejuvenation. *Genes to Cells* *17*, 337–343. 10.1111/j.1365-2443.2012.01595.x.
- 20 Singh, P.B., and Zacouto, F. (2010). Nuclear reprogramming and epigenetic rejuvenation. *J Biosci* *35*, 315–319. 10.1007/s12038-010-0034-2.
- 21 Singh, P.B., and Zhakupova, A. (2022). Age reprogramming: cell rejuvenation by partial reprogramming. *Development* *149*, dev200755. 10.1242/dev.200755.
- 22 Manukyan, M., and Singh, P.B. (2014). Epigenome rejuvenation: HP1β mobility as a measure of pluripotent and senescent chromatin ground states. *Sci Rep* *4*, 4789. 10.1038/srep04789.
- 23 Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* *14*, R115. 10.1186/gb-2013-14-10-r115.
- 24 Armstrong, N.J., Mather, K.A., Thalamuthu, A., Wright, M.J., Trollor, J.N., Ames, D., Brodaty, H., Schofield, P.R., Sachdev, P.S., and Kwok, J.B. (2017). Aging, exceptional longevity and comparisons of the Hannum and Horvath epigenetic clocks. *Epigenomics* *9*, 689–700. 10.2217/epi-2016-0179.
- 25 Vanyushin, B.F., Nemirovsky, L.E., Klimenko, V.V., Vasiliev, V.K., and Belozersky, A.N. (1973). The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents. *Gerontologia* *19*, 138–152.
- 26 Jung, M., and Pfeifer, G.P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biol* *13*, 7. 10.1186/s12915-015-0118-4.
- 27 Bell, C.G., Lowe, R., Adams, P.D., Baccarelli, A.A., Beck, S., Bell, J.T., Christensen, B.C., Gladyshev, V.N., Heijmans, B.T., Horvath, S., *et al.* (2019). DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome Biol* *20*, 249. 10.1186/s13059-019-1824-y.
- 28 Mendelsohn, A.R., and Larrick, J.W. (2019). Epigenetic Age Reversal by Cell-Extrinsic and Cell-Intrinsic Means. *Rejuvenation Research* *22*, 439–446. 10.1089/rej.2019.2271.
- 29 Bogdanović, O., Smits, A.H., de la Calle Mustienes, E., Tena, J.J., Ford, E., Williams, R., Senanayake, U., Schultz, M.D., Hontelez, S., van Kruijsbergen, I., *et al.* (2016). Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylogenetic period. *Nat Genet* *48*, 417–426. 10.1038/ng.3522.
- 30 Field, A.E., Robertson, N.A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., and Adams, P.D. (2018). DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Molecular Cell* *71*, 882–895. 10.1016/j.molcel.2018.08.008.
- 31 Unnikrishnan, A., Freeman, W.M., Jackson, J., Wren, J.D., Porter, H., and Richardson, A. (2019). The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacology & Therapeutics* *195*, 172–185. 10.1016/j.pharmthera.2018.11.001.
- 32 Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.-B., Gao, Y., *et al.* (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular Cell* *49*, 359–367. 10.1016/j.molcel.2012.10.016.
- 33 Lu, A.T., Fei, Z., Haghani, A., Robeck, T.R., Zoller, J.A., Li, C.Z., Lowe, R., Yan, Q., Zhang, J., Vu, H., *et al.* (2023). Universal DNA methylation age across mammalian tissues. *Nat Aging*. 10.1038/s43587-023-00462-6.
- 34 Horvath, S., and Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* *19*, 371–384. 10.1038/s41576-018-0004-3.
- 35 Gibbs, W.W. (2014). Biomarkers and ageing: The clock-watcher. *Nature* *508*, 168–170. 10.1038/508168a.
- 36 Gladyshev, V.N. (2021). The Ground Zero of Organismal Life and Aging. *Trends in Molecular Medicine* *27*, 11–19. 10.1016/j.molmed.2020.08.012.
- 37 Olova, N., Simpson, D.J., Marioni, R.E., and Chandra, T. (2019). Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging Cell* *18*, e12877. 10.1111/accel.12877.
- 38 Ohnuki, M., Tanabe, K., Sutou, K., Teramoto, I., Sawamura, Y., Narita, M., Nakamura, M., Tokunaga, Y., Nakamura, M., Watanabe, A., *et al.* (2014). Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *111*, 12426–12431. 10.1073/pnas.1413299111.
- 39 Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., *et al.* (2016). In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* *167*, 1719–1733.e12. 10.1016/j.cell.2016.11.052.
- 40 Scaffidi, P., and Misteli, T. (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* *11*, 440–445. 10.1038/nm1204.
- 41 Simpson, D.J., Olova, N.N., and Chandra, T. (2021). Cellular reprogramming and epigenetic rejuvenation. *Clin Epigenet* *13*, 170. 10.1186/s13148-021-01158-7.
- 42 Parras, A., Vélchez-Acosta, A., Desdín-Micó, G., Mrabti, C., Rechsteiner, C., Battiston, F., Branchina, C., Pérez, K., Sempoux, C., and Ocampo, A. (2022). In vivo reprogramming leads to premature death due to hepatic and intestinal failure. *bioRxiv*, 2022.05.27.493700. 10.1101/2022.05.27.493700.
- 43 Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation

- by the p53-p21 pathway. *Nature* 460, 1132–1135. 10.1038/nature08235.
- 44 Singh, P.B., and Newman, A.G. (2018). Age reprogramming and epigenetic rejuvenation. *Epigenetics & Chromatin* 11, 73. 10.1186/s13072-018-0244-7.
- 45 Brown, J.P., Wei, W., and Sedivy, J.M. (1997). Bypass of Senescence After Disruption of p21^{CIP1/WAF1} Gene in Normal Diploid Human Fibroblasts. *Science* 277, 831–834. 10.1126/science.277.5327.831.
- 46 Gill, D., Parry, A., Santos, F., Okkenhaug, H., Todd, C.D., Hernando-Herraez, I., Stubbs, T.M., Milagre, I., and Reik, W. (2022). Multi-omic rejuvenation of human cells by maturation phase transient reprogramming. *eLife* 11, e71624. 10.7554/eLife.71624.
- 47 Efe, J.A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., Chen, J., and Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 13, 215–222. 10.1038/ncb2164.
- 48 Nagy, A., and Nagy, K. (2010). The mysteries of induced pluripotency: where will they lead? *Nat Methods* 7, 22–24. 10.1038/nmeth.f.292.
- 49 Guo, L., Karoubi, G., Duchesneau, P., Shutova, M.V., Sung, H.-K., Tonge, P., Bear, C., Rogers, I., Nagy, A., and Waddell, T.K. (2017). Generation of Induced Progenitor-like Cells from Mature Epithelial Cells Using Interrupted Reprogramming. *Stem Cell Reports* 9, 1780–1795. 10.1016/j.stemcr.2017.10.022.
- 50 Gurdon, J.B., and Melton, D.A. (2008). Nuclear Reprogramming in Cells. *Science* 322, 1811–1815. 10.1126/science.1160810.
- 51 Yamanaka, S., and Blau, H.M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704–712. 10.1038/nature09229.
- 52 Sarkar, T.J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., Doan, L., Tran, C.M., Chu, C.R., Horvath, S., Qi, L.S., et al. (2020). Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nat Commun* 11, 1545. 10.1038/s41467-020-15174-3.
- 53 Lu, Y., Brommer, B., Tian, X., Krishnan, A., Meer, M., Wang, C., Vera, D.L., Zeng, Q., Yu, D., Bonkowski, M.S., et al. (2020). Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* 588, 124–129. 10.1038/s41586-020-2975-4.
- 54 Rodríguez-Matellán, A., Alcazar, N., Hernández, F., Serrano, M., and Ávila, J. (2020). In Vivo Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Reports* 15, 1056–1066. 10.1016/j.stemcr.2020.09.010.
- 55 Shahini, A., Rajabian, N., Choudhury, D., Shahini, S., Vydiam, K., Nguyen, T., Kulczyk, J., Santarelli, T., Ikhapoh, I., Zhang, Y., et al. (2021). Ameliorating the hallmarks of cellular senescence in skeletal muscle myogenic progenitors in vitro and in vivo. *Sci. Adv.* 7, eabe5671. 10.1126/sciadv.abe5671.
- 56 Browder, K.C., Reddy, P., Yamamoto, M., Haghani, A., Guillen, I.G., Sahu, S., Wang, C., Luque, Y., Prieto, J., Shi, L., et al. (2022). In vivo partial reprogramming alters age-associated molecular changes during physiological aging in mice. *Nat Aging* 2, 243–253. 10.1038/s43587-022-00183-2.
- 57 Chondronasiou, D., Gill, D., Mosteiro, L., Urduinguio, R.G., Berenguer-Llargo, A., Aguilera, M., Durand, S., Arahamian, F., Nirmalathasan, N., Abad, M., et al. (2022). Multi-omic rejuvenation of naturally aged tissues by a single cycle of transient reprogramming. *Aging Cell* 21. 10.1111/accel.13578.
- 58 Roux, A.E., Zhang, C., Paw, J., Zavala-Solorio, J., Malahias, E., Vijay, T., Kolumam, G., Kenyon, C., and Kimmel, J.C. (2022). Diverse partial reprogramming strategies restore youthful gene expression and transiently suppress cell identity. *Cell Systems* 13, 574–587.e11. 10.1016/j.cels.2022.05.002.
- 59 Cheng, F., Wang, C., Ji, Y., Yang, B., Shu, J., Shi, K., Wang, L., Wang, S., Zhang, Y., Huang, X., et al. (2022). Partial reprogramming strategy for intervertebral disc rejuvenation by activating energy switch. *Aging Cell* 21. 10.1111/accel.13577.
- 60 Alle, Q., Le Borgne, E., Bensadoun, P., Lemey, C., Béchir, N., Gabanou, M., Estermann, F., Bertrand-Gaday, C., Pessemeuse, L., Toupet, K., et al. (2022). A single short reprogramming early in life initiates and propagates an epigenetically related mechanism improving fitness and promoting an increased healthy lifespan. *Aging Cell* 21, e13714. 10.1111/accel.13714.
- 61 Yang, J.-H., Hayano, M., Griffin, P.T., Amorim, J.A., Bonkowski, M.S., Apostolides, J.K., Salfati, E.L., Blanchette, M., Munding, E.M., Bhakta, M., et al. (2023). Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging. *Cell* 186, 305–326.e27. 10.1016/j.cell.2022.12.027.
- 62 Tang, Y., Liu, M.-L., Zang, T., and Zhang, C.-L. (2017). Direct Reprogramming Rather than iPSC-Based Reprogramming Maintains Aging Hallmarks in Human Motor Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 359. 10.3389/fnmol.2017.00359.
- 63 Maza, I., Caspi, I., Zviran, A., Chomsky, E., Rais, Y., Viukov, S., Geula, S., Buenrostro, J.D., Weinberger, L., Krupalnik, V., et al. (2015). Transient acquisition of pluripotency during somatic cell transdifferentiation with iPSC reprogramming factors. *Nat Biotechnol* 33, 769–774. 10.1038/nbt.3270.
- 64 Chen, Y., Lüttmann, F.F., Schoger, E., Schöler, H.R., Zelarayán, L.C., Kim, K.-P., Haigh, J.J., Kim, J., and Braun, T. (2021). Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science* 373, 1537–1540. 10.1126/science.abg5159.
- 65 Hishida, T., Yamamoto, M., Hishida-Nozaki, Y., Shao, C., Huang, L., Wang, C., Shojima, K., Xue, Y., Hang, Y., Shokhirev, M., et al. (2022). In vivo partial cellular reprogramming enhances liver plasticity and regeneration. *Cell Reports* 39, 110730. 10.1016/j.celrep.2022.110730.
- 66 Wang, C., Rabadan Ros, R., Martinez-Redondo, P., Ma, Z., Shi, L., Xue, Y., Guillen-Guillen, I., Huang, L., Hishida, T., Liao, H.-K., et al. (2021). In vivo partial reprogramming of myofibers promotes muscle regeneration by remodeling the stem cell niche. *Nat Commun* 12, 3094. 10.1038/s41467-021-23353-z.
- 67 Göbel, C., Goetzke, R., Eggermann, T., and Wagner, W. (2018). Interrupted reprogramming into induced pluripotent stem cells does not rejuvenate human mesenchymal stromal cells. *Sci Rep* 8, 11676. 10.1038/s41598-018-30069-6.
- 68 Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., et al. (2013). Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* 341, 651–654. 10.1126/science.1239278.
- 69 Guan, J., Wang, G., Wang, J., Zhang, Z., Fu, Y., Cheng, L., Meng, G., Lyu, Y., Zhu, J., Li, Y., et al. (2022). Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature* 605, 325–331. 10.1038/s41586-022-04593-5.
- 70 Yang, J.-H., Petty, C.A., Dixon-McDougall, T., Lopez, M.V., Tyshkovskiy, A., Maybury-Lewis, S., Tian, X., Ibrahim, N.,

Chen, Z., Griffin, P.T., *et al.* (2023). Chemically induced reprogramming to reverse cellular aging. *Aging* 15, 5966–5989. 10.18632/aging.204896.

REFERENCES

- 1 Briggs, R., and King, T.J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 38, 455–463. 10.1073/pnas.38.5.455.
- 2 Gurdon, J.B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology* 4, 256–273. 10.1016/0012-1606(62)90043-X.
- 3 Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813. 10.1038/385810a0.
- 4 Mizutani, E., Ono, T., Li, C., Maki-Suetsugu, R., and Wakayama, T. (2008). Propagation of senescent mice using nuclear transfer embryonic stem cell lines. *genesis* 46, 478–483. 10.1002/dvg.20420.
- 5 Wakayama, S., Mizutani, E., and Wakayama, T. (2010). Production of Cloned Mice from Somatic Cells, ES Cells, and Frozen Bodies. In *Methods in Enzymology* (Elsevier), pp. 151–169. 10.1016/S0076-6879(10)76009-2.
- 6 Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., *et al.* (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science* 321, 1218–1221. 10.1126/science.1158799.
- 7 Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. 10.1016/j.cell.2006.07.024.
- 8 Lapasset, L., Milhavel, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ait-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., De Vos, J., *et al.* (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* 25, 2248–2253. 10.1101/gad.173922.111.
- 9 López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 153, 1194–1217. 10.1016/j.cell.2013.05.039.
- 10 López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2023). Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* 186, 243–278. 10.1016/j.cell.2022.11.001.
- 11 Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 4, 141–154. 10.1016/j.stem.2008.12.010.
- 12 Schaetzlein, S., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Kues, W.A., Dorsch, M., Manns, M.P., Niemann, H., and Rudolph, K.L. (2004). Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 8034–8038. 10.1073/pnas.0402400101.
- 13 Liu, L., Bailey, S.M., Okuka, M., Muñoz, P., Li, C., Zhou, L., Wu, C., Czerwiec, E., Sandler, L., Seyfang, A., *et al.* (2007). Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 9, 1436–1441. 10.1038/ncb1664.
- 14 Marión, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149–1153. 10.1038/nature08287.
- 15 Suhr, S.T., Chang, E.A., Tjong, J., Alcasid, N., Perkins, G.A., Goissis, M.D., Ellisman, M.H., Perez, G.I., and Cibelli, J.B. (2010). Mitochondrial Rejuvenation After Induced Pluripotency. *PLoS ONE* 5, e14095. 10.1371/journal.pone.0014095.
- 16 Herberts, C.A., Kwa, M.S., and Hermsen, H.P. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med* 9, 29. 10.1186/1479-5876-9-29.
- 17 Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., *et al.* (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502, 340–345. 10.1038/nature12586.
- 18 Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., *et al.* (2014). Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. *Cell* 156, 663–677. 10.1016/j.cell.2014.01.005.
- 19 Manukyan, M., and Singh, P.B. (2012). Epigenetic rejuvenation. *Genes to Cells* 17, 337–343. 10.1111/j.1365-2443.2012.01595.x.
- 20 Singh, P.B., and Zacouto, F. (2010). Nuclear reprogramming and epigenetic rejuvenation. *J Biosci* 35, 315–319. 10.1007/s12038-010-0034-2.
- 21 Singh, P.B., and Zhakupova, A. (2022). Age reprogramming: cell rejuvenation by partial reprogramming. *Development* 149, dev200755. 10.1242/dev.200755.
- 22 Manukyan, M., and Singh, P.B. (2014). Epigenome rejuvenation: HP1 β mobility as a measure of pluripotent and senescent chromatin ground states. *Sci Rep* 4, 4789. 10.1038/srep04789.
- 23 Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14, R115. 10.1186/gb-2013-14-10-r115.
- 24 Armstrong, N.J., Mather, K.A., Thalamuthu, A., Wright, M.J., Trollor, J.N., Ames, D., Brodaty, H., Schofield, P.R., Sachdev, P.S., and Kwok, J.B. (2017). Aging, exceptional longevity and comparisons of the Hannum and Horvath epigenetic clocks. *Epigenomics* 9, 689–700. 10.2217/epi-2016-0179.
- 25 Vanyushin, B.F., Nemirovsky, L.E., Klimenko, V.V., Vasiliev, V.K., and Belozersky, A.N. (1973). The 5-methylcytosine in DNA of rats. Tissue and age specificity and the changes induced by hydrocortisone and other agents. *Gerontologia* 19, 138–152.
- 26 Jung, M., and Pfeifer, G.P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biol* 13, 7. 10.1186/s12915-015-0118-4.
- 27 Bell, C.G., Lowe, R., Adams, P.D., Baccarelli, A.A., Beck, S., Bell, J.T., Christensen, B.C., Gladyshev, V.N., Heijmans, B.T., Horvath, S., *et al.* (2019). DNA methylation aging clocks: challenges and recommendations. *Genome Biol* 20, 249. 10.1186/s13059-019-1824-y.
- 28 Mendelsohn, A.R., and Larrick, J.W. (2019). Epigenetic Age Reversal by Cell-Extrinsic and Cell-Intrinsic Means. *Rejuvenation Research* 22, 439–446. 10.1089/rej.2019.2271.
- 29 Bogdanović, O., Smits, A.H., de la Calle Mustienes, E., Tena, J.J., Ford, E., Williams, R., Senanayake, U., Schultz, M.D., Hontelez, S., van Kruijsbergen, I., *et al.* (2016). Active DNA demethylation at enhancers during the vertebrate phylotypic period. *Nat Genet* 48, 417–426. 10.1038/ng.3522.
- 30 Field, A.E., Robertson, N.A., Wang, T., Havas, A., Ideker, T., and Adams, P.D. (2018). DNA Methylation Clocks in Aging: Categories, Causes, and Consequences. *Molecular Cell* 71, 882–895. 10.1016/j.molcel.2018.08.008.

- 31 Unnikrishnan, A., Freeman, W.M., Jackson, J., Wren, J.D., Porter, H., and Richardson, A. (2019). The role of DNA methylation in epigenetics of aging. *Pharmacology & Therapeutics* 195, 172–185. 10.1016/j.pharmthera.2018.11.001.
- 32 Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.-B., Gao, Y., *et al.* (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Molecular Cell* 49, 359–367. 10.1016/j.molcel.2012.10.016.
- 33 Lu, A.T., Fei, Z., Haghani, A., Robeck, T.R., Zoller, J.A., Li, C.Z., Lowe, R., Yan, Q., Zhang, J., Vu, H., *et al.* (2023). Universal DNA methylation age across mammalian tissues. *Nat Aging*. 10.1038/s43587-023-00462-6.
- 34 Horvath, S., and Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nat Rev Genet* 19, 371–384. 10.1038/s41576-018-0004-3.
- 35 Gibbs, W.W. (2014). Biomarkers and ageing: The clock-watcher. *Nature* 508, 168–170. 10.1038/508168a.
- 36 Gladyshev, V.N. (2021). The Ground Zero of Organismal Life and Aging. *Trends in Molecular Medicine* 27, 11–19. 10.1016/j.molmed.2020.08.012.
- 37 Olova, N., Simpson, D.J., Marioni, R.E., and Chandra, T. (2019). Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging Cell* 18, e12877. 10.1111/accel.12877.
- 38 Ohnuki, M., Tanabe, K., Sutou, K., Teramoto, I., Sawamura, Y., Narita, M., Nakamura, M., Tokunaga, Y., Nakamura, M., Watanabe, A., *et al.* (2014). Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 12426–12431. 10.1073/pnas.1413299111.
- 39 Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., *et al.* (2016). In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* 167, 1719–1733.e12. 10.1016/j.cell.2016.11.052.
- 40 Scaffidi, P., and Misteli, T. (2005). Reversal of the cellular phenotype in the premature aging disease Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nat Med* 11, 440–445. 10.1038/nm1204.
- 41 Simpson, D.J., Olova, N.N., and Chandra, T. (2021). Cellular reprogramming and epigenetic rejuvenation. *Clin Epigenet* 13, 170. 10.1186/s13148-021-01158-7.
- 42 Parras, A., Vilchez-Acosta, A., Desdín-Micó, G., Mrabti, C., Rechsteiner, C., Battiston, F., Branchina, C., Pérez, K., Sempoux, C., and Ocampo, A. (2022). In vivo reprogramming leads to premature death due to hepatic and intestinal failure. *bioRxiv*, 2022.05.27.493700. 10.1101/2022.05.27.493700.
- 43 Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nature* 460, 1132–1135. 10.1038/nature08235.
- 44 Singh, P.B., and Newman, A.G. (2018). Age reprogramming and epigenetic rejuvenation. *Epigenetics & Chromatin* 11, 73. 10.1186/s13072-018-0244-7.
- 45 Brown, J.P., Wei, W., and Sedivy, J.M. (1997). Bypass of Senescence After Disruption of p21^{CIP1/WAF1} Gene in Normal Diploid Human Fibroblasts. *Science* 277, 831–834. 10.1126/science.277.5327.831.
- 46 Gill, D., Parry, A., Santos, F., Okkenhaug, H., Todd, C.D., Hernando-Herraez, I., Stubbs, T.M., Milagre, I., and Reik, W. (2022). Multi-omic rejuvenation of human cells by maturation phase transient reprogramming. *eLife* 11, e71624. 10.7554/eLife.71624.
- 47 Efe, J.A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., Chen, J., and Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Biol* 13, 215–222. 10.1038/ncb2164.
- 48 Nagy, A., and Nagy, K. (2010). The mysteries of induced pluripotency: where will they lead? *Nat Methods* 7, 22–24. 10.1038/nmeth.f292.
- 49 Guo, L., Karoubi, G., Duchesneau, P., Shutova, M.V., Sung, H.-K., Tonge, P., Bear, C., Rogers, I., Nagy, A., and Waddell, T.K. (2017). Generation of Induced Progenitor-like Cells from Mature Epithelial Cells Using Interrupted Reprogramming. *Stem Cell Reports* 9, 1780–1795. 10.1016/j.stemcr.2017.10.022.
- 50 Gurdon, J.B., and Melton, D.A. (2008). Nuclear Reprogramming in Cells. *Science* 322, 1811–1815. 10.1126/science.1160810.
- 51 Yamanaka, S., and Blau, H.M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704–712. 10.1038/nature09229.
- 52 Sarkar, T.J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., Doan, L., Tran, C.M., Chu, C.R., Horvath, S., Qi, L.S., *et al.* (2020). Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nat Commun* 11, 1545. 10.1038/s41467-020-15174-3.
- 53 Lu, Y., Brommer, B., Tian, X., Krishnan, A., Meer, M., Wang, C., Vera, D.L., Zeng, Q., Yu, D., Bonkowski, M.S., *et al.* (2020). Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature* 588, 124–129. 10.1038/s41586-020-2975-4.
- 54 Rodríguez-Matellán, A., Alcazar, N., Hernández, F., Serrano, M., and Ávila, J. (2020). In Vivo Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Reports* 15, 1056–1066. 10.1016/j.stemcr.2020.09.010.
- 55 Shahini, A., Rajabian, N., Choudhury, D., Shahini, S., Vydiam, K., Nguyen, T., Kulczyk, J., Santarelli, T., Ikhaph, I., Zhang, Y., *et al.* (2021). Ameliorating the hallmarks of cellular senescence in skeletal muscle myogenic progenitors in vitro and in vivo. *Sci. Adv.* 7, eabe5671. 10.1126/sciadv.abe5671.
- 56 Browder, K.C., Reddy, P., Yamamoto, M., Haghani, A., Guillen, I.G., Sahu, S., Wang, C., Luque, Y., Prieto, J., Shi, L., *et al.* (2022). In vivo partial reprogramming alters age-associated molecular changes during physiological aging in mice. *Nat Aging* 2, 243–253. 10.1038/s43587-022-00183-2.
- 57 Chondronasiou, D., Gill, D., Mosteiro, L., Urdinguio, R.G., Berenguer-Llargo, A., Aguilera, M., Durand, S., Arahamian, F., Nirmalathasan, N., Abad, M., *et al.* (2022). Multi-omic rejuvenation of naturally aged tissues by a single cycle of transient reprogramming. *Aging Cell* 21. 10.1111/accel.13578.
- 58 Roux, A.E., Zhang, C., Paw, J., Zavala-Solorio, J., Malahias, E., Vijay, T., Kolumam, G., Kenyon, C., and Kimmel, J.C. (2022). Diverse partial reprogramming strategies restore youthful gene expression and transiently suppress cell identity. *Cell Systems* 13, 574–587.e11. 10.1016/j.cels.2022.05.002.
- 59 Cheng, F., Wang, C., Ji, Y., Yang, B., Shu, J., Shi, K., Wang, L., Wang, S., Zhang, Y., Huang, X., *et al.* (2022). Partial reprogramming strategy for intervertebral disc rejuvenation by activating energy switch. *Aging Cell* 21. 10.1111/accel.13577.
- 60 Alle, Q., Le Borgne, E., Bensadoun, P., Lemey, C., Béchir, N., Gabanou, M., Estermann, F., Bertrand-Gaday, C., Pessemeesse, L., Toupet, K., *et al.* (2022). A single short

reprogramming early in life initiates and propagates an epigenetically related mechanism improving fitness and promoting an increased healthy lifespan. *Aging Cell* 21, e13714. 10.1111/accel.13714.

61 Yang, J.-H., Hayano, M., Griffin, P.T., Amorim, J.A., Bonkowski, M.S., Apostolides, J.K., Salfati, E.L., Blanchette, M., Munding, E.M., Bhakta, M., *et al.* (2023). Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging. *Cell* 186, 305-326.e27. 10.1016/j.cell.2022.12.027.

62 Tang, Y., Liu, M.-L., Zang, T., and Zhang, C.-L. (2017). Direct Reprogramming Rather than iPSC-Based Reprogramming Maintains Aging Hallmarks in Human Motor Neurons. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 359. 10.3389/fnmol.2017.00359.

63 Maza, I., Caspi, I., Zviran, A., Chomsky, E., Rais, Y., Viukov, S., Geula, S., Buenrostro, J.D., Weinberger, L., Krupalnik, V., *et al.* (2015). Transient acquisition of pluripotency during somatic cell transdifferentiation with iPSC reprogramming factors. *Nat Biotechnol* 33, 769-774. 10.1038/nbt.3270.

64 Chen, Y., Lüttmann, F.F., Schoger, E., Schöler, H.R., Zelarayán, L.C., Kim, K.-P., Haigh, J.J., Kim, J., and Braun, T. (2021). Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science* 373, 1537-1540. 10.1126/science.abg5159.

65 Hishida, T., Yamamoto, M., Hishida-Nozaki, Y., Shao, C., Huang, L., Wang, C., Shojima, K., Xue, Y., Hang, Y., Shokhirev, M., *et al.* (2022). In vivo partial cellular reprogramming enhances liver plasticity and regeneration. *Cell Reports* 39, 110730. 10.1016/j.celrep.2022.110730.

66 Wang, C., Rabadan Ros, R., Martinez-Redondo, P., Ma, Z., Shi, L., Xue, Y., Guillen-Guillen, I., Huang, L., Hishida, T., Liao, H.-K., *et al.* (2021). In vivo partial reprogramming of myofibers promotes muscle regeneration by remodeling the stem cell niche. *Nat Commun* 12, 3094. 10.1038/s41467-021-23353-z.

67 Göbel, C., Goetzke, R., Eggermann, T., and Wagner, W. (2018). Interrupted reprogramming into induced pluripotent stem cells does not rejuvenate human mesenchymal stromal cells. *Sci Rep* 8, 11676. 10.1038/s41598-018-30069-6.

68 Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., *et al.* (2013). Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* 341, 651-654. 10.1126/science.1239278.

69 Guan, J., Wang, G., Wang, J., Zhang, Z., Fu, Y., Cheng, L., Meng, G., Lyu, Y., Zhu, J., Li, Y., *et al.* (2022). Chemical reprogramming of human somatic cells to pluripotent stem cells. *Nature* 605, 325-331. 10.1038/s41586-022-04593-5.

70 Yang, J.-H., Petty, C.A., Dixon-McDougall, T., Lopez, M.V., Tyshkovskiy, A., Maybury-Lewis, S., Tian, X., Ibrahim, N., Chen, Z., Griffin, P.T., *et al.* (2023). Chemically induced reprogramming to reverse cellular aging. *Aging* 15, 5966-5989. 10.18632/aging.204896.

Вклад авторов. Все авторы принимали равносильное участие при написании данной статьи.

Конфликт интересов – авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Данная работа является переводом двух статей, опубликованных на английском языке. Данный материал не был заявлен ранее для публикации в других изданиях и не находится на рассмотрении другими издательствами.

Финансирование: Данная работа была профинансирована Министерством здравоохранения Республики Казахстан в рамках программно-целевого финансирования научно-технической программы «Старение и здоровая продолжительность жизни» 2021-2023 гг. (ИРН: 51760/ПЦФ-МЗ РК-19).

Авторлардың үлесі. Барлық авторлар осы мақаланы жазуға тең дәрежеде қатысты.

Мүдделер қақтығысы: авторлар мүдделер қақтығысының жоқтығын мәлімдейді. Бұл жұмыс ағылшын тілінде жарияланған екі мақаланың аудармасы болып табылады. Бұл материал басқа басылымдарда жариялау үшін бұрын мәлімделмеген және басқа басылымдардың қарауына ұсынылмаған

Қаржыландыру: Бұл жұмысты Қазақстан Республикасы Денсаулық сақтау министрлігі 2021-2023 жылдарға арналған «Қартаю және салауатты өмір сүру ұзақтығы» ғылыми-техникалық бағдарламасын мақсатты қаржыландыру шеңберінде қаржыландырды. (ИРН: 51760/ПЦФ-МЗ РК-19).

Authors' Contributions. All authors participated equally in the writing of this article.

Conflicts of interest: the authors declare that they have no conflict of interest. This material has not been previously submitted for publication in other publications and is not under consideration by other publishers.

Funding: This work was funded by the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan as part of the targeted funding of the scientific and technical program “Aging and Healthy Life Expectancy” for 2021-2023 (ИРН: 51760/ПЦФ-МЗ РК-19).

Информация об авторах:

№	ФИО (полностью)	Должность, место работы	Телефон	Эл.почта
1	Жакупова Асем Сержановна	PhD, Постдокторант, Школа Медицины Назарбаев Университет, г. Астана, ул. Керей Жанибек хандар 5/1		a.zhakupova@nu.edu.kz
2	Турмухамбетова Анар Акылбековна	Д.м.н., Председатель Правления – Ректор НАО «Медицинский университет Караганды», г. Караганды, ул. Гоголя 40		turmuhambetova@qmu.kz
3	Салиев Тимур Муйдинович	PhD, Руководитель Научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной медицины имени Б. Атчабарова (НИИФПМ), г. Алматы, ул. Толе би 94		tim.saliev@gmail.com
4	Сингх Прим	PhD, Профессор генетики, Школа Медицины Назарбаев Университет, г. Астана, ул. Керей Жанибек хандар 5/1	+77082413425	prim.singh@nu.edu.kz