

Ujarzmianie starzenia: odmładzanie komórek, dedyferencjacja i transdyferencjacja

Aging subjugation: cell rejuvenation, dedifferentiation and transdifferentiation

Wojciech Sawicki, Jacek Malejczyk, Martyna Wróblewska

Zakład Histologii i Embriologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Różnicowanie komórkowe, starzenie i odmładzanie komórek cieszyły się szczególnym zainteresowaniem biologii i medycyny w ciągu ostatnich kilku dekad. W obecnym przeglądzie przedstawiono to w świetle mechanizmów prowadzących do odwracania różnicowania komórkowego – reprogramowania/dedyferencjacji oraz przekształcania jednych zróżnicowanych komórek w inne – transdyferencjacji. Przedstawiono teoretyczne podstawy i technologię odmładzania komórek z użyciem transdukcji/transfekcji genów/czynników transkrypcji i mikroRNA. Podkreślono niedoskonałości indukowanych i chemicznie indukowanych komórek pluripotencyjnych zwracając uwagę na ich potencjalną immuno- i karcinogenność. Przedstawiono krytycznie możliwości stosowania w terapii naturalnych i indukowanych komórek macierzystych. (*Gerontol Pol* 2015, 4, 143-58)

Słowa kluczowe: ujarzmianie starzenia, różnicowanie komórkowe, dedyferencjacja, transdyferencjacja, indukowane komórki pluripotencyjne

Abstract

Cellular differentiation, senescence and cell rejuvenation were the objects of the special interest of biology and medicine in the course of last decades. The review presents the mechanisms leading to reversion of cell differentiation (cell reprogramming or dedifferentiation) and to conversion of one type of differentiated cell into another type of differentiated cell (cell transdifferentiation). Theoretical foundations of cell rejuvenation, i.e. dedifferentiation, reprogramming and transdifferentiation are defined and followed by critical discussion on production/application of induced pluripotent cells. The paradigms of naturally appearing cell reprogramming and transdifferentiation are presented. Then the theoretical foundations of those phenomena for cell rejuvenation are described together with the technology of production of induced pluripotent cells. A critical view of the therapeutic utility of natural and induced stem cells is presented. (*Gerontol Pol* 2015, 4, 143-58)

Key words: aging subjugation, cellular differentiation, dedifferentiation, transdifferentiation, induced pluripotent cells

Wstęp

Ostatnie dekady przyniosły lawinę publikacji naukowych wyjaśniających molekularne i komórkowe mechanizmy starzenia [1-6]. Wśród tych teorii-przyczyn starzenia znajdują się najważniejsze: • modyfikacje epigenomu (metylacja cytozyny DNA, kod histonowy oraz mikroRNA i długie, niekodujące RNA [7-9] • zmiany genomu (mutacje i uszkodzenia DNA, skracanie telomerów oraz modyfikacje ruchomych elementów DNA [10,11] • stochastyczne uszkodzenia cząsteczek przez wolne rodniki i glikację [12-14] • zapalenie starcze [15].

Wyjaśnianie mechanizmów starzenia wiązało się nierozdzielnie z próbami jego powstrzymywania i cofania,

czyli z odmładzaniem i przedłużaniem życia. Wynikało ono z odwiecznych marzeń ludzi o nieśmiertelności, odmładzaniu i odtwarzaniu części ciała, które znajdowały odzwierciedlenie w mitach sumeryjskich, chińskich, indyjskich i greckich, min o eliksirze młodości oraz koralu i fontannie nieśmiertelności.

Jednocześnie z wyjaśnianiem mechanizmów starzenia rozwinęła się wiedza o mechanizmach różnicowania komórkowego. Klamrą spinającą obie te dziedziny był gwałtowny rozwój badań nad epigenomem. Wykazano mianowicie, że zmiany wzorców epigenomu zachodzą przez całe życie człowieka. Rozpoczynają się ich resetowaniem w czasie zapłodnienia i rozwoju przedimplantacyjnego. Następnie, począwszy od stadium moruli/blastocysty, wzorce epigenomu są odbudowywane, co

jest istotą różnicowania i powstania plejomorfizmu komórkowego. W wyniku zmian epigenomu powstaje linia komórek płciowych, wiele linii komórek somatycznych dających początek narządom oraz komórki macierzyste narządowe. W zaawansowanym życiu postnatalnym epigenom ulega dalszym zmianom (dryftowi), czego konsekwencją jest starzenie komórkowe i tkankowe. Poznanie mechanizmów różnicowania i starzenia komórkowego było punktem wyjścia dla opracowania technologii odwracania różnicowania komórkowego oraz powstrzymywania/cofania procesów starzenia. Dzięki nim wprowadzono technologie produkcji indukowanych komórek pluripotentnych, przekształcania jednych zróżnicowanych komórek w inne oraz powstrzymywania/cofania starzenia

Regeneracja tkanek

Regeneracja może być pełna, np. u salamandry lub niepełna, np. u ludzi. W pierwszym przypadku odtworzony jest kompletny i sprawny narząd, np. kończyna, a w drugim, w miejscu uszkodzenia powstaje na ogół łącznotkankowa/glejowa blizna. Komórki salamandry w miejscu uszkodzenia podlegają procesowi odwróconego różnicowania (odmładzaniu komórek poprzez reprogramowanie epigenomu) wytwarzając *blastemę*, tj. zespół embrionalnych komórek. Komórki blastemy rozmnażają się, a następnie różnicują do różnych tkanek wytwarzając w końcu narząd, np. kończynę. Natomiast u ludzi w miejscu uszkodzenia aktywują się komórki macierzyste narządowe, które po namnożeniu różnicują się na ogół w fibroblasty wytwarzające włókna, co prowadzi do zbliznowacenia. Od tej reguły istnieją u ludzi wyjątki. Należą do nich sprawna regeneracja wątroby z odtworzeniem hepatocytów, jej niemiąszowych komórek oraz przewodów żółciowych i naczyń krwionośnych, regeneracja włókien nerwowych obwodowego układu nerwowego, a także udokumentowana regeneracja odciętych paliczków.

Specjalną strategię regeneracji, odmładzania, i jak się sądzi także nieśmiertelności, opisano u meduzy (*Turritopsis nutricula*). Po uszkodzeniu meduzy, wszystkie komórki jej ciała cofają się w rozwoju do postaci embrionalnej wytwarzając polip, a następnie różnicują się ponownie przybierając formę dorosłego organizmu z całkowicie zreperowanym uszkodzeniem. Takie radykalne odmładzanie wszystkich komórek organizmu uważane jest niekiedy za przejaw nieśmiertelności. Zapewne do takiej nieśmiertelności będzie się dążyć w przyszłości, w przypadkach rozwijania strategii długowieczności u ludzi.

Od niedawna wiadomo, że białko p21 – inhibitor podziałów komórkowych – odgrywa negatywną rolę w mechanizmie regulowania regeneracji u ssaków. Jego brak (np. wskutek mutacji genu) prowadzi do wytwarzania w miejscu uszkodzenia rodzaju blastemy i polepszenia procesów regeneracji co najmniej u myszy. Manipulowanie białkiem p21 może w przyszłości doprowadzić do poprawienia efektywności regeneracji tkanek ludzkich [16-19].

Transdyferencjacja i dedyferencjacja

Odmładzanie komórek i tkanek oraz pobudzanie ich regeneracji jest procesem odwracania różnicowania komórkowego i cofania starzenia poprzez inicjowanie regeneracji uszkodzeń dokonanych przez proces starzenia lub procesy chorobowe. W wyniku tego tkanki niepełnosprawne są zastępowane tkankami sprawnymi. Natomiast regeneracja jest procesem odnawiania tkanek poprzez namnażanie i różnicowanie komórek; towarzyszy jej często odmładzanie komórek, tj. odwracanie procesu różnicowania komórkowego. To odmładzanie przywraca komórkom zdolność do podziałów i zwiększenia ich liczby. Następnie zwiększone w swojej liczbie komórki kierowane są na drogi celowanego różnicowania i wytwarzania sprawnej funkcjonalnie tkanki. Znajomość mechanizmów różnicowania komórkowego oraz umiejętność przekształcania jednych zróżnicowanych komórek w inne (transdyferencjacja), a także odwracania procesu różnicowania (dedyferencjacja) oraz ponowne różnicowanie (redyferencjacja) należą do stosowanych obecnie strategii odmładzania komórek i tkanek [20].

Transdyferencjacja

Transdyferencjacja jest przekształcaniem jednego rodzaju zróżnicowanych komórek w inny rodzaj zróżnicowanych komórek. Zachodzi w dwóch etapach: najpierw komórki stają się młodsze w procesie dedyferencjacji (odwróconego różnicowania) nabywając właściwości dzielenia się, a następnie różnicują się w inny niż wyjściowy rodzaj wyspecjalizowanych komórek. Proces ten obejmuje także konwersję jednych komórek macierzystych w inne. Niekiedy jednak transdyferencjacja przebiega bez dedyferencjacji, a w komórkach włączane są jednocześnie geny dla komórek zróżnicowanych wyjściowych i powstających w jej wyniku. Następnie geny komórki pierwszego rodzaju są wyłączane, a pozostają czynne tylko geny komórki drugiego rodzaju, które zmieniają jej fenotyp.

Transdyferencjacja występuje naturalnie w przelyku, kiedy nabłonek wielowarstwowy pod wpływem soku

żołądkowego przekształca się w nabłonek jednowarstwowy wydzielający śluz (przełyk Barreta). Występuje także w czasie regeneracji soczewki oka u salamandry i kurczenia, kiedy z komórek nabłonka tęczówki powstają komórki nabłonka soczewki. Jej pośrednim etapem jest dedyferencjacja komórek, tj. odwrócenie biegu różnicowania.

Technologia stosowania transdyferencjacji w praktyce jest względnie dobrze rozwinięta i z jej pomocą rutynowo przekształca się np. komórki egzokrynowe i komórki A trzustki w komórki B wysp Langerhansa oraz fibroblasty w kardiomiocyty i funkcjonujące neurony, a limfocyty B w makrofagi itp. [21-23]. Dokonuje się tego wprowadzając *in vitro* do zróżnicowanych komórek odpowiednio dobrane koktajle czynników transkrypcji. Symuluje to aktywność odpowiednich genów różnicowania przekształcając jeden rodzaj komórki zróżnicowanej w inny.

Ostatnio zastosowano technologię transdyferencjacji *in vivo* [24], która osiąga wydajność 20% przy zastosowaniu zazwyczaj 1-3 reprogramujących czynników transkrypcji. W ten sposób dokonano transdyferencjacji – komórki egzokrynowe trzustki → komórki B wysp Langerhansa, czy astrocyty → neuroblasty prądkowia. Na razie mankamentem tej metody jest nieumiejętność wytwarzania z transdyferencjonowanych komórek zorganizowanej, funkcjonującej tkanki, np. po wyprodukowaniu komórek B nie następuje ich organizacja w funkcjonującą wyspę Langerhansa.

▪ Dedyferencjacja

Innym sposobem odmładzania komórek i regeneracji tkanek jest dedyferencjacja, tj. cofanie komórek do wcześniejszego okresu ich różnicowania.

Naturalnie występuje ona w uszkodzeniach nerwów obwodowych, kiedy limfocyty (komórki Schwanna) włączają gen *JUN* i cofają proces różnicowania (dedyferencjacja) w stosunkowo niewielkim stopniu. Proces jest wspomagany przez zamknięcie szlaku przekazywania wewnątrzkomórkowych sygnałów NOTCH, co włącza proliferację oraz powoduje odłączenie się limfocytów od nerwu [25].

Wynikiem dedyferencjacji może być daleko posunięte cofnięcie różnicowania komórkowego do stadium pluripotencji (nazywane także reprogramowaniem), która naturalnie występuje w komórkach wczesnych stadiów rozwoju embrionalnego [26,27]. Tak daleko posuniętą dedyferencjację wywołuje się uaktywniając geny embrionalne. Reprogramowanie zachodzi tutaj w trzech etapach: • początkowania procesu, który w znacznej mierze zależy od proliferacji komórkowej początkują-

cej zmianę budowy kompleksów DNA/białka epigenomu • stadium pośredniego, w którym procesy zmiany epigenomu pogłębiają się • pojawienia się i utrwalenia pluripotencji, co wiąże się głównie z aktywnością genu *NANOG* i kodowanym przezeń czynnikiem transkrypcji.

W ciągu ostatnich ośmiu lat dokonano przełomu w opracowaniu technologii dedyferencjacji zróżnicowanych komórek ssaków, w tym człowieka. Dało to początek kontrolowanemu wytwarzaniu ludzkich komórek pluripotentnych oraz konwersji jednych zróżnicowanych komórek w inne zróżnicowane komórki.

Komórki pluripotentne produkowane z komórek zróżnicowanych

Znaczącym odkryciem dokonany przez Takahashi i Yamanaki w 2006 roku [28], potwierdzonym w ciągu następnych kilku lat przez innych, było wykazanie, że z pomocą stosunkowo prostej technologii genetycznej można reprogramować komórki, tzn. zmieniać ich fenotyp przez odmładzanie do stadium pluripotencji występującej naturalnie we wczesnym rozwoju embrionalnym. W wyniku takiego reprogramowania przekształca się całkowicie zróżnicowane komórki w komórki pluripotentne. Wprowadzano mianowicie do zróżnicowanych fibroblastów cztery czynniki transkrypcji (*OCT4*, *SOX2*, *Kruppl4* i *MYC*) normalnie produkowane przez nadrzędne geny (ich produkty włączają inne geny) we wczesnym rozwoju embrionalnym. Wystarczyło to do cofnięcia tych komórek w rozwoju i przekształcenia ich w komórki pluripotentne. Wkrótce okazało się, że niekoniecznie ten zestaw czynników transkrypcji prowadzi do pluripotencji, co zależy od rodzaju komórek. Na przykład, komórki macierzyste krwi pępowinowej potrzebowały tylko *OCT4* i *SOX2*, a komórki macierzyste nerwowe uzyskiwały pluripotencję po zastosowaniu tylko *OCT4*. Podobne wyniki uzyskiwano po wprowadzeniu do zróżnicowanych komórek genów kodujących te czynniki transkrypcji. Pluripotencja indukowanych komórek przejawiała się ich zdolnością do namnażania i różnicowania się w komórki trzech listków zarodkowych: endo-, mezo- i ektodermy [29-32].

W praktyce osiągnano pluripotencję przez transdukcję, czyli wprowadzenie do komórki czynnika transkrypcji/genu z pomocą wirusa lub plazmidu, albo przez transfekcję, czyli wprowadzenie czynnika transkrypcji/genu z pomocą permeabilizacji błon, liposomów, czynników fizycznych i innych. Obecnie znane są dziesiątki czynników transkrypcji oraz mikroRNA (hamuje translację enzymów epigenomu), które można używać rutynowo do reprogramowania zróżnicowanych komórek w komórki pluripotentne, a następnie redyferencjonować je w roz-

maite, wyspecjalizowane komórki, np. w kardiomiocyty, komórki nerwowe, hepatocyty, czy komórki mięśni szkieletowych.

Pluripotencjne komórki uzyskane z pomocą takiej technologii nazywane są indukowanymi macierzystymi komórkami pluripotencjnymi (iPS), a proces ich wytwarzania – bezpośrednim reprogramowaniem w przeciwieństwie do reprogramowania przez środowisko, które jest cechą komórek macierzystych narządowych.

W ciągu ostatnich kilku lat technologia reprogramowania komórek zróżnicowanych i wytwarzania komórek pluripotencjnych, a także technologia transdiferencjacji poczyniły znaczne postępy [33]. Jednak takie manipulacje genami stwarzają niebezpieczeństwo indukcji nowotworzenia.

Ostatnio opracowano technologię reprogramowania całkowicie zróżnicowanych komórek w komórki pluripotencjne z pominięciem skomplikowanych technik transdukcji i transfekcji czynników transkrypcji/genów z zamiarem obniżenia potencjalnej karcinogenności. Używa się do tego celu prostych związków chemicznych – inhibitorów i agonistów enzymów epigenomu, cytokin i receptorów, które modyfikują epigenom. Z pomocą koktajlów takich związków produkuje się indukowane chemicznie komórki pluripotencjne, których właściwości są zbliżone do ES i iPS. Takie indukowane chemicznie komórki pluripotencjne nazywane są w skrócie ciPS [34].

Indukowane komórki pluripotencjne, iPS i ciPS

Umiejętność produkowania iPS i ciPS otwiera duże możliwości dla ich stosowania w terapii komórkowej, m.in. dla spowalniania starzenia oraz leczenia i modelowania chorób. Jednak badania nad ich otrzymywaniem i zastosowaniem w terapii znajdują się w początkowej fazie i rodzą wiele niejasności. Zakres, w jakim iPS i ciPS mogą w pełni symulować naturalne, pluripotencjne ES jest ciągle kontrowersyjny, tak jak nieznane są ich potencjalna immuno- i karcinogenność. Wprawdzie ekspresja ich MHC jest niska to jednak aktywacja genów embrionalnych dla osiągnięcia pluripotencji niesie teoretyczną możliwość powstawania z iPS i ciPS co najmniej potworniakoraków i potworniaków.

Niebezpieczeństwo powstawania nowotworów może być pomniejszone/wyeliminowane przez stosowanie odpowiednich mikroRNA (hamują translację przez blokowanie mRNA) dla wytwarzania iPS. Na przykład, zastosowanie mikroRNA-302 wycisza ekspresję kilku genów, w tym genu-markera komórek nowotworowych (BMI) i genu dla cyklin D/E, pobudzając jednocześnie

gen p16, którego produkt białkowy hamuje rozmnażanie komórek. Sądzi się, że to jednoczesne hamowanie i pobudzanie ekspresji niektórych genów upodobnia iPS do normalnych komórek zarodkowych i zmniejsza ryzyko nowotworzenia [35]. Ponadto epigenom iPS zawiera pamięć o ich tkankowym pochodzeniu, co może zmieniać właściwości różnicowania tych komórek [36].

Niezależnie od tych zastrzeżeń, stosowanie technologii inżynierii genetycznej, a nawet odpowiednio dobranych koktajli prostych związków chemicznych, pozwala produkować iPS na ogół z wydajnością nieprzekraczającą 0,2%. Jednak szybki postęp w tej dziedzinie dobrze rokuje na polepszenie tej wydajności. Ciągłe słabo opracowanym etapem używania w praktyce iPS i ciPS po ich namnożeniu jest redyferencjacja w pożądany rodzaj komórek zróżnicowanych, które wytwarzałyby sprawne funkcjonalnie tkanki.

Dane o długości telomerów iPS oraz efektywność wytwarzania iPS z komórek ludzi w różnym wieku są kontrowersyjne [37] i wymagają dokładniejszych badań, chociaż na ogół nawet z komórek zróżnicowanych dziewięćdziesięciolatków można otrzymywać sprawne iPS.

Technologie odmładzania komórek z pomocą cofania różnicowania mają tę zaletę, że mogą być wykonywane na komórkach pacjentów w układach autogenicznych, a także *in vivo* i *in situ* z prawdopodobnym pominięciem reakcji immunologicznych.

Dużą zaletą tej technologii jest możliwość kontroli *in vitro* odmładzanych komórek pod względem chemicznym i genetycznym przed ich podaniem pacjentowi. Umożliwia to eliminowanie szkodliwych cech komórek, np. mutacji DNA.

Praktyczne wykorzystanie komórek macierzystych naturalnych i indukowanych

Właściwości pluripotencjnych indukowanych komórek macierzystych nie są w pełni wyjaśnione. Dotyczy to szczególnie ich immuno- i karcinogenności. Ogranicza to w znacznym stopniu ich stosowanie w terapii. Natomiast uni-, bi- i multipotencjne komórki macierzyste narządowe mimo starzenia mają znaczną potencję w pomnażaniu liczby i różnicowaniu komórek, a więc także w odmładzaniu tkanek i przedłużaniu życia całego organizmu. W związku z tym używane są po aktywacji i/lub izolacji oraz przeszczepieniu do przywracania funkcji tkanek. Stosuje się je w układach auto- i allogenicznych, przy czym w tym ostatnim przypadku wymagają na ogół uzdatnienia spowalniającego proces odrzucania.

Najczęstszymi sposobami wykorzystania naturalnych komórek macierzystych narządowych w terapii są: • aktywacja *in situ*, wzbudzenie proliferacji komórkowej,

a następnie kontrolowanej redyferencjacji Aktywacja następuje najczęściej pod wpływem urazu i uszkodzenia tkanki, np. w mięśni szkieletowym uszkodzonym treningiem. Uszkodzenie uaktywnia gen *zic-1* w komórkach macierzystych. Produkt tego genu aktywuje szlaki transdukcji sygnałów aktywujące proliferację komórkową • podawanie ich do miejsca uszkodzenia/ ubytku tkanek. Przykładem są komórki macierzyste/progenitory hemopoetyczne lub mięśnia szkieletowego wstrzykiwane do fragmentu mięśnia sercowego uszkodzonego zawałem serca. Tutaj komórki macierzyste proliferują i różnicują się w kardiomiocyty. Ostatnio z pomocą komórek macierzystych/progenitorowych układu węchowego uzyskano regenerację włókien nerwowych przeciętego rdzenia kręgowego • układowe (np. dotętnicze, dożylnie, dootrzewnowe) lub inne wstrzykiwanie komórek macierzystych w układzie autogenicznym lub allogenicznym. Celem jest zastąpienie własnych komórek macierzystych straconych w wyniku radio-, chemioterapii lub chorób, np. białaczek. Innym celem jest dotarcie wstrzykniętych komórek macierzystych do miejsc uszkodzeń i reperacji tkanek, w których z reguły toczy się proces zapalny, bowiem komórki macierzyste posiadają receptory dla chemokin wytwarzanych w miejscu zapalenia. Ponadto komórki macierzyste wytwarzają wiele czynników humoralnych działających parakrynowo lub układowo po ich przeszczepieniu poprawiając funkcjonowanie tkanek • terapia genowa komórek macierzystych (najczęściej krwi) stosowana zwłaszcza w leczeniu pierwotnych niedoborów odporności wy-

wołanych mutacją jednego genu. Do pobranych od pacjenta komórek macierzystych szpiku wprowadza się *in vitro*, z pomocą np. transdukcji wirusowej prawidłowy gen zastępujący gen niewydolny – przyczynę choroby. Zmienione genetycznie komórki są transfuzowane pacjentowi, rozmnażają się i wytwarzają nowe pokolenia zdrowych komórek krwi • hodowanie *in vitro* własnych komórek macierzystych pacjenta w bioaktywnych matrycach (np. kolagenowych), kształtowanych np. z pomocą drukarki 3D. W ten sposób można wytwarzać sztucznie całe narządy produkowane na miarę.

Zaletą stosowania narządowych komórek macierzystych podawanych w układzie autogenicznym jest brak reakcji immunologicznej. Wadami są niedoskonałości technologii wynikające z trudności w kontrolowaniu redyferencjacji w pożądane komórki oraz nieumiejętność wytwarzania z takich zróżnicowanych komórek sprawnie funkcjonującej tkanki (np. mięśnia sercowego), pracującej synchronicznie z całym narządem (38-41).

Źródła komórek macierzystych

Najczęstszym źródłem komórek macierzystych narządowych używanych w terapii są szpik kostny, krew obwodowa ludzi dorosłych i krew pępowinowa, tkanka tłuszczowa żółta, komórki glejowe osłonkowe węchowe i mięsień szkieletowy

Konflikt interesów/Conflict of interest

Brak/None

Piśmiennictwo

1. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. Hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153: 1194-217.
2. Issa JP. Aging and epigenetics drift: a vicious cycle. *J Clin Invest*. 2014; 124: 24-9.
3. Lee HJ, Hore TA, Reik W. Reprogramming the methylome: erasing memory and creating diversity. *Cell Stem Cell*. 2014; 14: 710-9.
4. Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock *Cell*. 2012; 148: 46-57.
5. Sawicki W, Malejczyk J, Wróblewska M. Starzenie: mechanizmy epigenetyczne i genetyczne. *Gerontol Pol*. 2015; 2: 68-73.
6. Sawicki W, Malejczyk J, Wróblewska M. Mechanizmy starzenia: uszkodzenie cząsteczek i zapalenie starcze. *Gerontol Pol*. 2015; 2: 74-9.
7. Korkmaz A, Manchester LC, Topal T, Ma S, Tan DX, Reiter RJ. Epigenetic mechanisms in human physiology and diseases. *J Exp Integr Med*. 2011; 1: 139-47.
8. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*. 2011; 21: 381-95.
9. Fatica A, Bozzani I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nature Rev Genet*. 2014; 15: 7-21.

10. Aubert G, Lansdorp P. Telomeres and aging. *Physiol Rev.* 2008; 88: 557-9.
11. Kennedy SR, Loeb LA, Herr AJ. Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration. *Mech Ageing Dev.* 2012; 133: 118-26.
12. Best PB. Nuclear DNA damage as direct cause of aging. *Rejuvenation. Res.* 2009; 12: 199-208.
13. Grillo MA, Colombatto S. Advanced glycation end-products (AGEs): involvement in aging and neurodegenerative diseases. *Amino Acids.* 2008; 35: 29.
14. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free. Radic Res.* 2012; 46: 382-419.
15. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2014; 69: S4-S9.
16. Lee TH, Snyder ER, Liu Y, Wang J, Kim SK. A cellular, molecular, and pharmacological basis for appendage regeneration in mice. *Genes & Dev.* 2015; 29: 2097-2107.
17. Poss KD. Advances in understanding tissue regenerative capacity and mechanisms in animals. *Nat Rev Genet.* 2010; 11: 710-22.
18. King RS, Newmark PA. The cell biology of regeneration. *J Cell Biol.* 2012; 196: 553-62.
19. Bedelbaeva K, Snyder A, Gourevitch D, Clark L, Zhang XM, Leferovich J i wsp. Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107: 5845-50.
20. Jopling C, Boue S, Belmonte JCI. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011; 12: 79-89.
21. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to β -cells. *Nature.* 2008; 455: 627-32.
22. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang PZ, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 2010; 463: 1035-41.
23. Efe JA, Hilcove S, Kim J, Zhou H, Ouyang K, Wang G i wsp. Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat Cell Bio.* 2011; 13: 215-22.
24. Fu L, Zhu X, Yi F, Liu GH, Izpisua Belmonte JC. Regenerative medicine: transdifferentiation in vivo. *Cell Res.* 2014; 24: 141-2.
25. Woodhoo A, Alonso MBD, Droggiti A, Turmaine M, D'Antonio M, Parkinson DB i wsp. Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci.* 2009; 12: 839-47.
26. Sawicki W, Malejczyk J, Wróblewska M. Ujarzmianie starzenia: różnicowanie komórkowe i komórki macierzyste. *Gerontol Pol.* 2015; 3: 131-6.
27. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature.* 2010; 465: 704-12.
28. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006; 126: 663-76.
29. Szabo E, Rampalli S, Risueno R, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A i wsp. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 2010; 468: 521-6.
30. Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N i wsp. The ectopic expression of Pax4 in mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell.* 2009; 138: 449-62.
31. Caiazzo M, Dell'Anno M, Dvoretzkowa E, Lazarevic D, Taverna S, Leo D i wsp. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature.* 2011; 476: 224-7.
32. Hanna J, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell.* 2010; 143: 508-25.
33. Shenoy A, Blelloch R. MicroRNA induced transdifferentiation. *Biol Rep.* 2012; 4: 3-10.
34. Jung DW, Kim WH, Williams DR. Reprogram or reboot: small molecule approaches for the production of induced pluripotent stem cells and direct cell reprogramming. *ACS. Chem Biol.* 2014; 9: 80-95.
35. Lin SL, Ying SY. Mechanism and method for generating tumor-free iPS cells using intronic microRNA miR-302 induction. *Methods Mol Biol.* 2013; 936: 295-312.
36. Lapasset L, Milhavel O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Ait-Hamou N i wsp. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Develop.* 2011; 25: 2248-53.

37. Rohani L, Johnson AA, Arnold A, Stolzing A The aging signature: a hallmark of induced pluripotent stem cells? *Aging Cell* 2014; 13: 2-7
38. Behfar A, Crespo-Diaz R, Terzic A, Gersh BJ Cell therapy for cardiac repair-lessons from clinical trials *Nat Rev Cardiol* 2014; 11: 232-46
39. Weiss DJ Concise review: current status of stem cells and regenerative medicine in lung biology and diseases *Stem Cells* 2014; 32: 16-25
40. Stoll EA. Advances toward regenerative medicine in the central nervous system: challenges in making stem cell therapy a viable clinical strategy. *Mol Cell Ther.* 2014; 2: 12-21.
41. Tabakow P, Raisman G, Fortuna W, Czyż M, Huber J, Li D i wsp. Functional regeneration of supraspinal connections in patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging *Cell Transplant.* 2014; 23: 1631-55.