

ΑΡΘΡΟ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗΣ

Γενετική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων: Εφαρμογές, Προκλήσεις και Προοπτικές

Αναστασία Μελισσαράτου, Γεώργιος. Μηλίτσης, Αλέξανδρος Περβανίδης, Δημήτριος Προβίδας, Αθανάσιος Χαμζάς, Θεοδώρα Κατσίλα, Γεώργιος Π. Πατρινός*
Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πάτρα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων υπόσχεται την ενδελεχή ανάλυση της ετερογένειας μεταξύ κυττάρων, ακόμη και του ίδιου ιστού. Πρόκειται για μια καινοτόμο προσέγγιση, η οποία μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση της κυτταρικής και μοριακής συμπεριφοράς, σε σχέση με άλλες προϋπάρχουσες μεθόδους. Με τη μελέτη του γονιδιώματος, των πρωτεϊνών, των ορμονών και των μεταβολιτών ανα-

πτύσσονται πολλά νέα πεδία στο χώρο της κυτταρικής βιολογίας με προεκτάσεις στους κλάδους της πρόληψης, διάγνωσης και θεραπείας. Συμπερασματικά, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων και ο ρόλος της στις μελλοντικές ερευνητικές και θεραπευτικές προοπτικές θεωρούν καίρια, μολονότι οι κλινικές εφαρμογές είναι σήμερα ακόμη περιορισμένες.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΥΡΗΤΗΡΙΟΥ: Μεμονωμένα κύτταρα, γενετική διάγνωση, γονιδίωμα, κυτταρική και μοριακή συμπεριφορά, εξατομικευμένη ιατρική

Εισαγωγή

Η ανθρώπινη ζωή ξεκινά με την ύπαρξη ενός μοναδικού κυττάρου, του ζυγωτού. Αρχικά, αυτό υπόκειται σε πολλαπλές μιτωτικές διαιρέσεις από τις οποίες προκύπτουν τρισεκατομμύρια κύτταρα, τα οποία περνούν από διάφορα στάδια διαφοροποίησης και ανάπτυξης, σχηματίζοντας τους κυτταρικούς τύπους από τους οποίους θα προκύψουν οι ιστοί και τα όργανα.

Ωστόσο, κατά τη διάρκεια των μιτωτικών διαιρέσεων το γενετικό υλικό δεν αντιγράφεται με απόλυτη ακρί-

βεια, οδηγώντας στην ύπαρξη σωματικών μεταλλάξεων. Μέχρι τον πλήρη σχηματισμό του ανθρώπινου οργανισμού, αυτές οι μεταλλάξεις συσσωρεύονται. Έτσι, προκύπτει ένας οργανισμός που τα κύτταρα του δεν αποτελούνται από ένα μοναδικό γονιδίωμα, αλλά από πολλές διαφορετικές εκδοχές του αρχικού. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «μωσαϊκισμός». [1].

Είναι σημαντικό το ότι η πλειοψηφία των μεθόδων που εφαρμόζονται στην ανάλυση του γονιδιώματος αγνοούν την ύπαρξη του μωσαϊκισμού και κατά συνέ-

* Αντεπιστέλλων Συγγραφέας

Γεώργιος Π. Πατρινός, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πανεπιστημιούπολη, Ρίο, 265 04, Πάτρα, Τηλέφωνο Επικοινωνίας: 2610-962339, Fax: 2610-969955, Email: gpatrinos@upatras.gr

πεια, λαμβάνεται ένας μέσος όρος πληροφοριών από τα υπό μελέτη κύτταρα. Στο πεδίο της κυτταρικής βιολογίας, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων αναφέρεται στη μελέτη κυττάρων απομονωμένων από ιστούς πολυκύτταρων οργανισμών [2]. Μελετώντας ένα κύτταρο τη φορά, το αποτέλεσμα είναι σίγουρο ότι προέρχεται από εκείνο το συγκεκριμένο κύτταρο. Ένα κύτταρο μπορεί, ενδεικτικά, να παρακολουθηθεί καθώς διπλασιάζεται, να βρεθεί ο αριθμός των διαιρέσεων στη μονάδα του χρόνου. Το ενδιαφέρον σε αυτούς τους υπολογισμούς εστιάζεται στη συσχέτιση των καρκινικών κυττάρων με τα φυσιολογικά. Είναι ήδη γνωστό ότι η μελέτη των κυττάρων εν ζωή μπορεί να αυξήσει δραματικά την κατανόηση της συσχέτισης μοριακών γεγονότων που πραγματοποιούνται αδιάλειπτα σε κάθε κύτταρο. Κάθε κύτταρο είναι περισσότερο ή λιγότερο διαφορετικό από κάποιο άλλο, ακόμα και αν ανήκει στον ίδιο κυτταρικό τύπο. Η κυτταρική ετερογένεια είναι ευρέως γνωστή στα βακτήρια και πλέον γίνεται ραγδαία αντιληπτή και στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων προσφέρει ένα μέσο για την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό διαφορετικών τύπων κυττάρων και δύναται να αποδείξει την ετερογένεια μεταξύ κυττάρων ίδιου τύπου [2, 3]. Επιπλέον, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων επιτρέπει την ταυτοποίηση σπάνιων κυττάρων με διαγνωστική σημασία, όπως τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Τέλος, εκτιμάται ότι έχει τη δυνατότητα να προσφέρει πληροφορίες για την εν τω βάθει κατανόηση της παθοβιολογίας της ανθρώπινης ασθένειας, αλλά και της διαδικασίας της γήρανσης. Στο άρθρο αυτό, περιγράφονται οι εφαρμογές και προοπτικές της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων.

Σύγχρονες εφαρμογές της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων

Η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως, τόσο για ερευνητικούς σκοπούς, όσο και για διαγνωστικούς, ή και θεραπευτικούς [4]. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι καθώς στο σύνολό της, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων και οι αντίστοιχες τεχνικές είναι σχετικά πρόσφατες, και μεγάλο μέρος από αυτές είναι σε στάδιο ανάπτυξης και βελτιστοποίησης, η κλινική εφαρμογή των περισσότερων απέχει ακόμα αρκετά [2, 3, 5, 6].

Ίσως η σημαντικότερη από τις εφαρμογές της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων αφορά την αντιμετώπιση του καρκίνου. Η πολυπλοκότητα αυτής της ασθένειας δρα αποτρεπτικά στην ανακάλυψη μιας αποτελεσματικής διαγνωστικής τεχνικής. Η ανάλυση μεμονωμένων

κυττάρων μπορεί να προσφέρει σημαντική βοήθεια στην κατανόηση της ασθένειας με αναλύσεις μεμονωμένων κυττάρων καρκινικών όγκων. Αναλύσεις τέτοιων κυττάρων σε διάφορα στάδια της ανάπτυξής τους μας βοηθούν στην παρακολούθηση της προόδου της ασθένειας, πριν και μετά την θεραπεία, αλλά και στον εντοπισμό ή/και στην ταυτοποίηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων. Επίσης, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων προσδιορίζει την ετερογένεια των κυττάρων ενός όγκου.

Επιπρόσθετα, οι τεχνικές της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων βοηθούν στο συσχετισμό της πρωτεϊνικής έκφρασης με την κυτταρική μορφολογία, μια σύνδεση που χάνεται, όταν αποκωδικοποιείται το γενετικό προφίλ από κλασικά δείγματα. Σε αντίθεση με τις κλασικές τεχνικές, οι οποίες έχουν περιορισμούς στον αριθμό των πληροφοριών που μπορούν να εξαχθούν από ένα κύτταρο, με την ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων, πλέον, μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες σχετικά με την πρωτεϊνική έκφραση, τη μορφολογία και την ιστολογία υπό μελέτη [6].

Η αναγεννητική ιατρική είναι ένας ακόμη τομέας που ωφελείται από την ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων. Η αναγεννητική ιατρική έχει ως στόχο τη θεραπεία πλήθους παθήσεων ή τραυματισμών με αναγέννηση/ αντικατάσταση κυττάρων ιστών ή οργάνων, χρησιμοποιώντας ως βασικά εργαλεία τα βλαστικά κύτταρα. Εδώ, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων μπορεί να έχει μεγάλη συμβολή στον χαρακτηρισμό των κυττάρων (προσδιορισμός χαρακτηριστικών, τα οποία διαφοροποιούν κάθε κυτταρική σειρά), καθώς πολλές έρευνες σχετικά με τα βλαστικά κύτταρα έχουν δείξει μεγάλη ετερογένεια σε κυτταρικό επίπεδο, μεταξύ διαφοροποιημένων και αδιαφοροποίητων βλαστικών κυττάρων. Επιπλέον, η κατανόηση των μηχανισμών της μεταγραφής των βλαστικών κυττάρων σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξής τους αποτελεί πολύ σημαντική γνώση για το πώς τα βλαστικά κύτταρα αντιδρούν στις μεταβολές του περιβάλλοντός τους (π.χ. σε τραυματισμούς), καθώς και για την ίδια τη διαφοροποίησή τους.

Η γενετική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων, επίσης, μπορεί να αποδειχτεί ένα ανεκτίμητο εργαλείο για την καλύτερη μελέτη μονοκύτταρων μικροοργανισμών. Αναλύσεις μεμονωμένων κυττάρων με ειδικές τεχνικές μπορούν να περιγράψουν σχετικά αγνώστους πληθυσμούς μικροοργανισμών, να διευκολύνουν τη μελέτη κυττάρων που είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν *in vitro*, καθώς και πληροφορίες για τον τρόπο ανάπτυξης μονοκύτταρων μικροοργανισμών στα πλαίσια μιας αποικίας. Επίσης, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων αναμένε-

ται να προσφέρει μεγάλη βοήθεια στην καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών παρέχοντας αναλυτικές εξατομικευμένες πληροφορίες για στελέχη ανθεκτικά σε αντιβιοτικά, αλλά και τον εντοπισμό και τη μελέτη επιδημικών μικροβίων ή τοξικογόνων επιμολυντών στα τρόφιμα.

Συγκεκριμένοι κυτταρικοί τύποι είναι φορείς έως και 300-400 γονιδίων-στόχων άκρως εξειδικευμένων φαρμάκων. Επομένως, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων για τον προσδιορισμό τέτοιων γονιδίων βελτιώνει την ακρίβεια και το εύρος δράσης των φαρμάκων αυτών, ενώ είναι και σημαντικό εργαλείο για την απλοποίηση βιολογικών συστημάτων, επιτρέποντας, έτσι, την ευκολότερη προσομοίωση της δράσης των φαρμάκων αυτών.

Σύγχρονες τεχνικές προσεγγίσεις πριν και κατά την γενετική ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων

Η ανάπτυξη τεχνικών ανάλυσης του περιεχομένου στοχευμένων κυττάρων αποτελεί μια σημαντική κατεύθυνση στο πεδίο της βιοαναλυτικής χημείας. Αρχικά, η παρατήρηση των χρωμοσωμάτων, των οργανιδίων ή ο εντοπισμός συγκεκριμένων πρωτεϊνών λάμβανε χώρα με το μικροσκόπιο. Σήμερα, οι τεχνικές αναλυτικής μεγέθυνσης, όπως η μικροσκοπία έχουν τη δυνατότητα για διάκριση και εντοπισμό μακρομορίων μέσα στο υπό εξέταση κύτταρο, καθώς επίσης και τον εντοπισμό ακόμη μικρότερων μορίων, όπως ορμόνες και μεταβολίτες.

Αρχικά, κάθε χημική ανάλυση ξεκινά με την προετοιμασία του δείγματος και η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων δεν αποτελεί εξαίρεση. Ελεύθερα κύτταρα, όπως οι ζύμες, τα βακτήρια ή τα κύτταρα του αίματος μπορούν να απομονωθούν και να χρησιμοποιηθούν άμεσα, ωστόσο, τα κύτταρα από ιστούς πρέπει πρώτα να απομονωθούν, ενζυμικά, χημικά ή μηχανικά από το στρώμα και άλλα, προσαρτημένα ομοειδή ή ετεροειδή κύτταρα, με τα οποία συγκρατούνται με ισχυρούς διακυτταρικούς δεσμούς [7]. Η πρόσφατη ανάπτυξη της νανομηχανικής τεχνολογίας μπορεί να προσφέρει οργανολογία μηχανικής πρόσληψης κυττάρων από ιστούς. Αφού κατεργαστούν σωστά, καθίστανται δυνατές μελέτες με μικροσκόπιο ή διαδικασίες διαχωρισμού του κυτταρικού πληθυσμού πριν από την ανάλυση. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μέθοδος Laser Capture Microdissection (LCM, Μικροεκτομή με Συλλογή κυττάρων με Laser) [8]. Η μέθοδος LCM προσφέρει την δυνατότητα απομόνωσης υποπληθυσμών κυττάρων από ιστούς με τη χρήση μικροσκοπίου. Καθιστά δυνατή την άμεση συλλογή κυττάρων ενδιαφέροντος

ή την απομόνωση συγκεκριμένων κυττάρων, από ποικιλία δειγμάτων, αποκόποντας τα ανεπιθύμητα ώστε να προκύψει καθαρός ιστός εμπλουτισμένος σε συγκεκριμένους κυτταρικούς πληθυσμούς. Η μέθοδος αυτή δε βλάπτει ή μεταβάλλει την μορφολογία και τη χημεία του δείγματος που συλλέγεται, ούτε τα περιβάλλοντα κύτταρα. Παράλληλα, η μέθοδος LCM μπορεί να εφαρμοστεί σε ποικιλία δειγμάτων ιστών. Στη συνέχεια λαμβάνουν χώρα οι διαδικασίες διαχωρισμού. Η ευρύτερα διαδεδομένη διαδικασία διαχωρισμού κυττάρων είναι η κυτταρομετρία ροής (flow cytometry). Σύμφωνα με αυτή, ένα φθορίζον αντίσωμα συνδέεται με τα αντιγόνα της κυτταρικής μεμβράνης επισημαίνοντας τα επιθυμητά κύτταρα.

Οι τεχνικές ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων διακρίνονται σε δύο (2) κατηγορίες, την ανάλυση πυρηνικών οξέων και την ανάλυση πρωτεϊνών/μεταβολιτών [3, 4, 9]. Οι ερευνητές μπορούν να μελετήσουν τη διαδικασία της μεταγραφής για να αποκαλύψουν νέους μηχανισμούς κυτταρικής ανάπτυξης, μεταβολισμού και ανωμαλιών, πραγματοποιώντας αλληλούχιση mRNA [10, 11]. Καθίσταται, λοιπόν, εφικτό να προσδιοριστεί η απόκριση και συμπεριφορά κυτταρικών υποπληθυσμών σε βιοχημικά σήματα και άλλα ερεθίσματα σε κρίσιμα στάδια της ανάπτυξής τους ή όταν παρουσιάζουν ανώμαλους φαινότυπους. Επιπλέον, τα microRNA (miRNAs) ρυθμίζουν την έκφραση των mRNA και εμπλέκονται σε βιολογικές διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση και ο κυτταρικός κύκλος, καθώς επίσης και σε ασθένειες, όπως ο καρκίνος και οι καρδιοαγγειοπάθειες. Λόγω των παραπάνω, η μελέτη των miRNA προσφέρει γνώση για τις διαφορές μεταξύ παρεμφερών κυττάρων.

Οι αναλύσεις μεμονωμένων κυττάρων που βασίζονται στη χρήση αντισωμάτων ως κυρίαρχη τεχνολογία ανίχνευσης έχουν εξαιρετική πιστότητα και ακρίβεια. Με την αλληλούχιση, σήμερα, του συνόλου των εξωνίων συγκεκριμένων/μοναδικών κυττάρων μπορούμε να αποκαλύψουμε την πραγματική ανομοιογένεια ενός δείγματος [11]. Μάλιστα, κατά την αλληλούχιση στοχευμένων περιοχών DNA, δίδεται η δυνατότητα να αναγνωρίζονται σε κυτταρικούς πληθυσμούς σωματικές μεταλλάξεις σε ήδη γνωστά γονίδια που είναι μη ανιχνεύσιμες σε ομοειδή δείγματα. Παρόλο που η ανάλυση των πρωτεϊνών και των μεταβολιτών είναι πιο δύσκολη από εκείνη των πυρηνικών οξέων, η ανάλυση μεμονωμένων κυτταρικών πρωτεϊνών με φασματομετρία μάζας δίνει μια πιο κατανοητή εικόνα της κυτταρικής επιφάνειας και των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών-δεικτών [12]. Με την παραπάνω μέθοδο μπορούμε να πάρουμε δεδομένα σχετικά με την κλινική εικόνα τον φαινότυπο, τους

μεταγραφικούς παράγοντες, την κυτταρική αύξηση και τον κυτταρικό κύκλο. Με τη φασματομετρία μάζας μπορούμε να ποσοτικοποιήσουμε χιλιάδες πρωτεΐνες και τις μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις τους [13-16].

Σύγχρονες προκλήσεις κατά την ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων

Οι μεθοδολογίες ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων αναπτύχθηκαν και εξελίχθηκαν ραγδαία τα τελευταία 5 χρόνια, όχι μόνο παρέχοντας μια ενδελεχέστερη βιολογική εικόνα σε σχέση με τις τρέχουσες μεθοδολογίες, αλλά και εισάγοντας μια εντελώς νέα αντίληψη, αυτή που δεν θεωρεί την ετερογένεια ενός κυτταρικού πληθυσμού ως αποτρεπτικό στοιχείο για την ενδελεχή μελέτη του [2].

Εντούτοις, η πλειοψηφία των μεθοδολογιών ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων προέρχονται από ακαδημαϊκά περιβάλλοντα και συνεπώς, απαιτούν συγκεκριμένες εργαστηριακές δεξιότητες και ενίοτε διεπιστημονικές υποδομές, που δυσχεραίνουν την κλινική τους εφαρμογή. Επιπλέον, οι αλγόριθμοι που απαιτούνται για την εν τω βάθει ανάλυση των δεδομένων είναι λιγότερο ώριμοι, συγκριτικά με εκείνους που χρησιμοποιούνται στα υπόλοιπα πεδία της Ωμικής, όταν εξετάζεται ένας ολόκληρος κυτταρικός πληθυσμός, δίχως εστίαση στη φυσική κυτταρική μονάδα. Σε αυτό το σημείο προκύπτει και η άμεση ανάγκη για προτυποποίηση, η οποία μόλις έχει ξεκινήσει για την πολυχρωματική κυτταρομετρία ροής, την κυτταρομετρία μάζας και την RNA αλληλούχιση μεμονωμένων κυττάρων [2].

Η ορθή πρακτική και εφαρμογή της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων έχει επιφέρει ελάχιστο προβληματισμό, γεγονός που απαιτείται άμεσα να γίνει αντιληπτό. Η Βιοηθική διερευνά τις ηθικές προκλήσεις που εμφανίζουν οι σύγχρονες εξελίξεις στη Βιολογία και την Ιατρική και ως εκ τούτου, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων δε θα μπορούσε να αποτελεί εξαίρεση. Ειδικότερα, αν αναλογιστούμε την αναγεννητική ιατρική, καθίσταται σαφές πως εστιάζει σε καινοτόμες κυτταρικές προσεγγίσεις ή μεθοδολογίες μοριακής θεραπείας, στις οποίες τα βλαστικά κύτταρα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και φυσικά, το ενδιαφέρον επικεντρώνεται στο κύτταρο

ως μονάδα. Υπό αυτό το πρίσμα, οποιαδήποτε εφαρμογή της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων σχετίζεται με την αναγεννητική ιατρική, εγείρει τους ίδιους ηθικούς προβληματισμούς με αυτούς περί βλαστικών κυττάρων [17, 18].

Μελλοντικές προοπτικές της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων

Αδιαμφισβήτητος στόχος για το μέλλον είναι η ελαχιστοποίηση του επεμβατικού μεγέθους, του χρόνου και των επαναλήψεων της βιοψίας στον ασθενή με ταυτόχρονη συλλογή μεγάλου αριθμού κυττάρων. Ακόμη, θα είναι σημαντικό τα κύτταρα να διατηρούνται στον μέγιστο αριθμό τους και να μην χάνονται ή υποβαθμίζονται κατά την προετοιμασία και τη διάρκεια των εργαστηριακών δοκιμών, και να παραμένουν όλα πληροφοριακά ακέραια. Επίσης, απαιτείται υποδομή αποθήκευσης μεγάλου όγκου πληροφοριών.

Η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων έχει να προσφέρει πολλά, τόσο στον τομέα της κλινικής ιατρικής, όσο και στον τομέα της βιολογίας και της φαρμακευτικής [2, 3, 5, 6]. Με την ανάπτυξη των προσεγγίσεων της ανάλυσης μεμονωμένων κυττάρων θα βελτιωθεί η αντίληψή μας αναφορικά με την κυτταρική ποικιλομορφία, και με τις βιολογικές επιπτώσεις που συσχετίζονται με την ευαισθησία σε ασθένειες και τη γήρανση. Παράλληλα, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων θα συνεισφέρει στον καλύτερο προσδιορισμό των κυτταρικών τύπων, αφού μέχρι στιγμής δεν υπάρχει κοινή άποψη για το τι πραγματικά καθορίζει έναν κυτταρικό τύπο. Η σύγχρονη αντίληψη βασίζεται σε χαρακτηριστικά, όπως η κλινική εικόνα, ο μορφότυπος, ο γονότυπος, ο συνολικός φαινότυπος ή η προέλευση των κυττάρων. Μεγάλης κλίμακας αναλύσεις θα βοηθήσουν την χαρτογράφηση των γνωστών κυτταρικών τύπων, αλλά και την ταυτοποίηση σπάνιων ή ακόμη και νέων. Επιπλέον, υπάρχει δυνατότητα ανάλυσης σπάνιων κυτταρικών γεγονότων. Τέλος, η ανάλυση μεμονωμένων κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στην πλήρη κατανόηση του σωματικού μωσαϊσμού και στον προσδιορισμό της κυτταρικής γενεολογίας και προέλευσης [19]. ●

ABSTRACT

Genetic analysis of single cells: Applications, challenges and perspectives

Anastasia Melissaritou, Georgios Militsis, Alexandros Pervanidis, Dimitrios Providas, Athanasios Hamzas, Theodora Katsila, George P. Patrinos

University of Patras, School of Health Sciences, Department of Pharmacy, Patras, Greece

Single-cell analysis holds the promise to delineate cell heterogeneity, even among cells of the same tissue. This is a novel approach that can provide a deeper understanding of the cellular and molecular behavior in comparison to other existing methods. No doubt, the “unravelling” of the genome, the study of proteins, hormones and other metabolites leads

to the development of many new paths in the scientific area of cell biology with benefits regarding to prevention, diagnosis and treatment. Thus, single-cell analysis and its prospect for the hold near future promise for both scientific research and treatment, even though clinical applications are currently limited.

KEY WORDS: Single cells; genetic diagnosis; genome; cellular and molecular behavior; personalized medicine

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Schuster, K.C., E. Urlaub, and J. Gapes, Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *Journal of Microbiological Methods*, 2000. 42(1): p. 29-38.
2. Heath, J.R., A. Ribas, and P.S. Mischel, Single-cell analysis tools for drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2016. 15(3): p. 204-216.
3. Wang, D. and S. Bodovitz, Single cell analysis: the new frontier in 'omics'. *Trends in biotechnology*, 2010. 28(6): p. 281-290.
4. Shirai, M., T. Taniguchi, and H. Kambara, Emerging applications of single-cell diagnostics, in *Chemical Diagnostics*. 2012, Springer. p. 99-116.
5. Speicher, M.R., Single-cell analysis: toward the clinic. *Genome medicine*, 2013. 5(8): p. 1.
6. Carlo, D.D. and L.P. Lee, Dynamic single-cell analysis for quantitative biology. *Analytical chemistry*, 2006. 78(23): p. 7918-7925.
7. Schmid, A., et al., Chemical and biological single cell analysis. *Current opinion in biotechnology*, 2010. 21(1): p. 12-20.
8. Espina, V., et al., Laser-capture microdissection. *Nature protocols*, 2006. 1(2): p. 586-603.
9. Van der Aa, N., et al., Preimplantation genetic diagnosis guided by single-cell genomics. *Genome medicine*, 2013. 5(8): p. 1.
10. Tang, F., et al., mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nature methods*, 2009. 6(5): p. 377-382.
11. Ståhlberg, A., M. Kubista, and P. Åman, Single-cell gene-expression profiling and its potential diagnostic applications. *Expert review of molecular diagnostics*, 2011. 11(7): p. 735-740.
12. Bendall, S.C., et al., Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science*, 2011. 332(6030): p. 687-696.
13. Naik, A., et al., Towards single-molecule nanomechanical mass spectrometry. *Nature nanotechnology*, 2009. 4(7): p. 445-450.
14. Hofstadler, S.A., et al., Analysis of single cells with

- capillary electrophoresis electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 1996. 10(8): p. 919-922.
15. Jimenez, C., et al., Rapid Communication: Neuropeptide Expression and Processing as Revealed by Direct Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Single Neurons. *Journal of neurochemistry*, 1994. 62(1): p. 404-407.
 16. Dell, A. and H.R. Morris, Glycoprotein structure determination by mass spectrometry. *Science*, 2001. 291(5512): p. 2351-2356.
 17. Merviel, P., et al., [The bioethics law revision: comparative analysis of contributions from different public and professional offices. Assisted Reproductive Technology, embryo and stem cells research, umbilical cord blood bank]. *Gynecologie, obstetrique & fertilité*, 2009. 37(9): p. 733-741.
 18. Green, R.M., Benefiting from 'evil': an incipient moral problem in human stem cell research. *Bioethics*, 2002. 16(6): p. 544-556.
 19. Frumkin, D., et al., Genomic variability within an organism exposes its cell lineage tree. *PLoS Comput Biol*, 2005. 1(5): p. e50.