

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK / REVIEW ARTICLE

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA HEPATOCELULÁRNÍHO KARCINOMU – KONVENČNÍ BIOMARKERY A SPEKTROSKOPIE KREVNÍ PLAZMY LABORATORY DIAGNOSIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA – CONVENTIONAL BIOMARKERS AND BLOOD PLASMA SPECTROSCOPY

Petr Hříbek^{1,2✉}, Lucie Habartová³, Johana Klasová¹, Kristýna Kubíčková¹, Tomáš Kupsa², Tomáš Tůma²,
Vladimír Setnička³, Petr Urbánek¹

¹ Ústřední vojenská nemocnice – vojenská fakultní nemocnice Praha, Interní klinika 1. LF UK a ÚVN Praha, Česká republika

² Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany, Hradec Králové, Česká republika

³ Ústav analytické chemie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Česká republika

Přijato 19. července 2022.

Akceptováno 11. října 2022.

Zveřejněno 1. prosince 2023.

Souhrn

Hepatocelulární karcinom (HCC) je nejčastější primární zhoubný nádor jater, který se ve většině případů rozvíjí v terénu jaterní cirhózy různé etiologie. Jen časná stadia onemocnění jsou indikována k chirurgické, potenciálně kurativní léčbě. Jen přibližně třetina HCC je zachycena v časných stadiích. Screeningovým vyšetřením rizikových skupin pacientů je ultrasonografie jater (USG) v 6měsíčních intervalech. USG má vedle svých známých výhod i značné limitace. Senzitivita USG pro časná stadia HCC se pohybuje pouze okolo 60 %. Vzhledem k tomu a i proto, že se jedná o expert dependentní metodu, existuje naléhavá potřeba objektivního biomarkeru HCC. Alfa-fetoprotein je obecně vnímán jako biomarker HCC, nicméně jeho senzitivita a specificita pro účely diagnostiky či dokonce screeningu je nedostatečná. Byly zkoumány i jiné další biomarkery s různými výsledky, ale žádný nedosáhl efektivity USG. Poměrně novým přístupem k této problematice je spektroskopie krevní plazmy, která prokázala svoji účinnost u různých onemocnění. Z pohledu HCC se spektroskopii krevní plazmy věnovalo jen málo studií. Autoři prezentují v přehledu i vlastní práci, kdy spektroskopie krevní plazmy dosáhla senzitivity a specificity v odlišení nemocných s jaterní cirhózou bez HCC a s ním 88 %, respektive 90 %. Přes veškeré snahy nebyl dosud dostatečně spolehlivý a validovaný biomarker HCC použitelný pro účely časné diagnostiky a screeningu identifikován.

Klíčová slova: hepatocelulární karcinom; screening; jaterní cirhóza; biomarker; onkomarker; spektroskopie; alfa-fetoprotein

✉ Ústřední vojenská nemocnice - Vojenská fakultní nemocnice Praha, U Vojenské nemocnice 1200,
169 02 Praha 6, Česká republika
petr.hribek@uvn.cz

Summary

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary malignant tumor of the liver, which in most cases develops in the field of liver cirrhosis of various etiologies. Only the early stages of the disease are indicated for surgical, potentially curative treatment. Only about a third of cases of HCC are caught in the early stages. The screening examination of risk groups of patients is liver ultrasonography (USG) at 6-month intervals. Besides its well-known advantages, USG has significant limitations. The sensitivity of USG for the early stages of HCC is only around 60 %. Considering this and also because it is an expert-dependent method, there is an urgent need for an objective HCC biomarker. Alpha-fetoprotein is generally perceived as a biomarker of HCC, however, its sensitivity and specificity for diagnostic or even screening purposes are insufficient. Other biomarkers have been investigated with varying results, but none have reached the effectiveness of USG. A relatively new approach to this problem is blood plasma spectroscopy, which has proven its effectiveness in various diseases. From the perspective of HCC, few studies have focused on blood plasma spectroscopy. In the review, the authors also present their work, where blood plasma spectroscopy achieved a sensitivity and specificity of 88 % and 90 %, respectively, in differentiating patients with liver cirrhosis without and with HCC. Despite all efforts, a sufficiently reliable and validated biomarker of HCC usable for early diagnosis and screening has not yet been identified.

Key words: Hepatocellular carcinoma; screening; liver cirrhosis; biomarker; oncomarker; spectroscopy; alpha-fetoprotein

Úvod

Hepatoceulární karcinom (HCC) je nejčastější primární zhoubný nádor jater (1). HCC se ve většině případů rozvíjí v terénu chronických jaterních chorob ve stadiu jaterní cirhózy. Výjimkou z tohoto pravidla je chronické onemocnění virem hepatitidy B (HBV) a nealkoholová steatohepatitida (NASH), kdy může HCC vzniknout i v necirhotických játrech. HCC u pacientů bez chronické jaterní choroby je velice vzácným onemocněním.

V České republice je dle posledních dat ÚZIS incidence HCC 9,0 případů/100 000 obyvatel/rok (2). Velká část nemocných s jaterní cirhózou vyvine v průběhu života HCC. Ve francouzské kohortě pacientů s HCC byla zjištěna 4letá kumulativní incidence HCC 11,4 % na podkladě cirhózy při chronické HCV (3). Pacienti s HCC v terénu jaterní cirhózy jsou klasifikováni pro účely stagingu a z něj vyplývající terapie podle tzv. barcelonské klasifikace (Barcelona Clinic Liver Cancer, BCLC) (4). HCC je maligním onemocněním s vysoce nepříznivou prognózou. Celkové 5leté přežití napříč stadii je 12 % (5). Naproti tomu u pacientů s časně diagnostikovaným HCC je možná kurativní léčba a jejich přežívání je excelentní. U nemocných, u kterých je v souladu se stagingem možná radikální chirurgická léčba – resekce nebo transplantace, přesahuje 5leté celkové přežívání 80 % (6, 7). Pacienti v terminálním stadiu BCLC D mají medián celkového přežívání (OS) 3,4 měsíce (8). Z uvedeného je zřejmé, že časná diagnostika HCC je kritickým bodem, který přímo determinuje prognózu pacienta.

Screeningovou metodou pro HCC je ultrasonografie jater (USG). Surveillance se pak rozumí opakovaná a pravidelná aplikace screeningové metody u dané skupiny osob v riziku onemocnění. Aplikace surveillance je možná u pacientů s identifikovaným rizikovým onemocněním. Jedním z problémů zůstává už jen samotná identifikace pacientů v riziku. Je pochopitelné, že pacient s plně vyjádřenou jaterní cirhózou v podobě dekompenzace onemocnění, bude zařazen do surveillance HCC. V řadě případů však manifestace cirhózy a HCC proběhne současně. U velkého množství pacientů, zejména s NASH, je diagnostika HCC často pozdní pro klinickou latenci onemocnění (9). Může to být i zažitým vnímáním jaterní cirhózy jako nemoci alkoholiků a nitrožilních uživatelů drog, a to i u části odborné veřejnosti. Na možnost jaterní cirhózy se u nemocných s metabolickým syndromem myslí méně. V současné době se surveillance HCC opírá o USG vyšetření jater v intervalu 6 měsíců, přičemž tato metodika je doporučována americkou a evropskou asociací pro studium jaterních chorob (AASLD, EASL) (10, 11). USG je metoda velice výhodná z důvodu relativně nízké ceny a nulové radiační zátěže pro pacienta.

Nevýhody lze spatřovat ve vysokých nárocích na zkušenost vyšetřujícího – tzv. expert-dependentní metoda. Dále je limitována obtížnou vyšetřitelností až nemožností validního vyšetření u obézních pacientů nebo u nemocných po různých intraabdominálních operačních výkonech. Z těchto důvodů se udává senzitivita USG v identifikaci časných, a tedy kurativně léčitelných, stadií HCC pouze okolo 60 % (12). Vzhledem k tomuto faktu existuje naléhavá snaha o identifikaci objektivního biomarkeru snadno získatelného z periferní krve rizikových pacientů, který by splňoval nároky na adekvátní senzitivitu a specifitu pro časnou diagnostiku HCC.

Onkomarkery hepatokarcinogeneze

Jako onkomarkery se označuje poměrně různorodá skupina látek, které jsou produkovány nádorovými buňkami nebo jsou ve zvýšené koncentraci v nádorových buňkách. Zároveň by měla být splněna podmínka, že tyto látky nejsou za normálních okolností v krevní plazmě nebo moči vůbec přítomny, anebo jsou jen v minimálním množství. Nemusí jít jen o „neaktivní“ molekuly, onkomarkery mohou být i hormony nebo enzymy. Onkomarkery až na výjimky – prostatický specifický antigen (PSA) – neslouží jako diagnostický nástroj, ale jejich dominantním využitím je možnost sledování odezvy na léčbu či záchyt relapsu onemocnění. V oblasti nádorových onemocnění jater je nejdéle užívaný onkomarker alfa-fetoprotein (AFP).

V dalším textu budou popsány v souvislosti s HCC používané či zkoumané onkomarkery se zvláštním přihlédnutím ke spektroskopické analýze krevní plazmy, jakožto možnému zcela odlišnému směru laboratorní diagnostiky primárního karcinomu jater, kterým se kolektiv autorů v současné době zabývá.

Alfa-fetoprotein

Alfa-fetoprotein je glykoprotein, který po stránce funkce odpovídá fetálnímu albuminu. Normální je elevace koncentrace AFP v amniové tekutině plodu a krevní plazmě matky. AFP je exprimován ve fetálních játrech a žloutkovém vaku plodu. Zajímavá je v tomto kontextu československá stopa, kdy jedna z prvních systematických prací o vyšší koncentraci AFP u nádorových a nenádorových stavů byla publikována československými autory již v roce 1968 (13). AFP byl dříve součástí screeningového vyšetření HCC spolu s USG dle standardů jak AASLD, tak EASL. AFP může být i významně zvýšen při řadě stavů, které nejsou spojeny s hepatokarcinogenezí. Je prokázáno i významné kolísání koncentrací AFP při dekompenzaci jaterní cirhózy (14) nebo způsobené aktivitou HBV či HCV infekce (15). Nízké koncentrace AFP 20 ug/l sice splní požadované nároky na senzitivitu, ale jejich specifita je velmi nízká a pro screeningové vyšetření nevhodná. Pokud je cut-off AFP zvýšeno na 200 ug/l, dosáhne vysoké specifity pro HCC, ale senzitivita pro diagnostiku HCC se pohybuje okolo 22 % (16) a nelze ji tak použít pro screening. Těmto výsledkům neodporují ani naše vlastní zkušenosti. V našem souboru 180 nemocných s HCC mělo 52 % pacientů koncentraci AFP do 20 ug/l. Při zvýšení cut-off na 100 ug/l se jednalo o 68 % pacientů. V případě časných, potenciálně kurativních, stadií dle BCLC klasifikace 0+A mělo 69 % pacientů v souboru plazmatickou koncentraci AFP do 20 ug/l (17). Lze říci, že rutinní použití AFP jakožto diagnostického markeru HCC není opodstatněné. Role AFP v péči o pacienty s HCC spočívá v současnosti v odhadu biologické povahy nádoru. Studie z registru Surveillance, Epidemiology, and End Results Program (SEER), která zahrnovala 78743 pacientů s HCC prokázala, že nemocní s abnormálním AFP měli vyšší riziko pooperačních relapsů a horší OS oproti pacientům s normálními hladinami AFP (18). AFP >1000 ug/l například představuje vlastně faktickou kontraindikaci k transplantaci jater pro HCC ve francouzském alokačním systému, protože je spojen s přidělením tolika negativních bodů, že pacient reálně transplantován nebude (19).

Další onkomarkery HCC

Alfa-fetoprotein L3 (Lens culinaris agglutinin-reactive glycoform of AFP)

Alfa-fetoprotein L3 představuje jednu z frakcí AFP, která je produkována maligně transformovanými hepatocyty. AFP L3 vykazuje jen nepatrně vyšší specifitu pro HCC než AFP (83,12 % vs. 81,82 %), nicméně jeho senzitivita pro onemocnění je téměř o 20 % nižší (50,63 % vs. 68,35 %) (20). Z tohoto důvodu není AFP L3 vhodným onkomarkerem pro časnou diagnostiku HCC. Možné využití AFP L3 představuje spíše monitorace efektu lokoregionální léčby, kdy pacienti s poklesem AFP L3 po transarteriální chemoembolizaci dosahují signifikantně delšího mediánu OS (42,9 vs. 15,4 měsíce) (21).

PIVKA II (protein induced by vitamin K absence/antagonist-II)

PIVKA II, jinak též des- γ -carboxy-prothrombin, je abnormální molekula protrombinu, která je produkována v důsledku posttranslačního defektu karboxylace prekursoru protrombinu v buňkách HCC (22). Jako takový se tedy zdál být vhodným onkomarkerem HCC. Zásadním nedostatkem pro tento účel je možnost jeho falešné elevace při deficitu vitamínu K, která je častým jevem u jaterní insuficience, nebo při užívání kumarinových derivátů (warfarin) (23). Významně vyšší spolehlivosti v diagnostice HCC ve srovnání s AFP dosahuje PIVKA II až v případech nádorů >5 cm v průměru (24). Z těchto důvodů nelze ani o PIVKA II uvažovat jako o vhodném markeru časně diagnostiky HCC.

Spektroskopie krevní plazmy v diagnostice zhoubných nádorových onemocnění

Proces karcinogeneze může vést ke změnám nejen v koncentraci, ale i struktuře biomolekul, které mohou být detekovány spektroskopickou analýzou krevní plazmy. Krevní plazma je snadno získatelná odběrem periferní žilní krve, který je rutinně v rámci diagnostických vyšetření prováděn a nenese prakticky žádná rizika komplikací pro pacienta. Tyto výhody jsou v kombinaci se spektroskopii dále potencovány. Spektroskopické metody totiž nevyžadují použití reagentů a jsou relativně rychlé a levné a mohou umožnit identifikaci pro určité choroby specifických spektrálních změn ve studovaných vzorcích (25). Odlišnosti ve spektrálních vzorcích jsou podmíněny změnami na úrovni molekulární struktury. Pokud hovoříme o plazmatických biomolekulách, mohou být takové změny způsobeny různými patologickými procesy v organizmu, například Parkinsonovou chorobou (26). Zásadním problémem jsou limitace konvenčních spektroskopických metod – infračervené (IČ) a Ramanovy spektroskopie. Vysoký počet interferujících fluoreskujících látek a nízké koncentrace cílových molekul jsou hlavními omezeními spektroskopické analýzy krevní plazmy (27). Nicméně mnoho biomolekul a potenciálních biomarkerů je chirálních. Jejich struktura a chování je tedy vhodné pro sledování chiroptickou spektroskopií, která je ze své podstaty citlivá na trojrozměrné uspořádání chirálních molekul, a je tak schopna lépe identifikovat i jemné konformační změny (28).

Kolektiv pracovníků Ústavu analytické chemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze (VŠCHT) v rámci výzkumných projektů časně diagnostiky nádorových a degenerativních onemocnění vyvinul jedinečnou metodiku spektroskopické analýzy krevní plazmy, která využívá kombinace konvenční infračervené (IČ) a Ramanovy spektroskopie a pokročilých spektroskopických metod – elektronového cirkulárního dichroismu (ECD) a Ramanovy optické aktivity (ROA). Tento unikátní přístup již poskytl slibné výsledky v identifikaci spektrálních markerů karcinomu pankreatu a kolorektálního karcinomu, a proto se nabízí i možnost využít tuto metodiku pro studium HCC, jakožto dalšího zhoubného onemocnění gastrointestinálního traktu (29, 30). Použití spektroskopie krevní plazmy v diagnostice HCC se věnovalo jen málo zahraničních studií. Dle nejlepšího vědomí autorů však žádná z publikovaných studií nepoužila námi zvolenou a v zásadě jedinečnou kombinaci čtyř uvedených metod (31, 32).

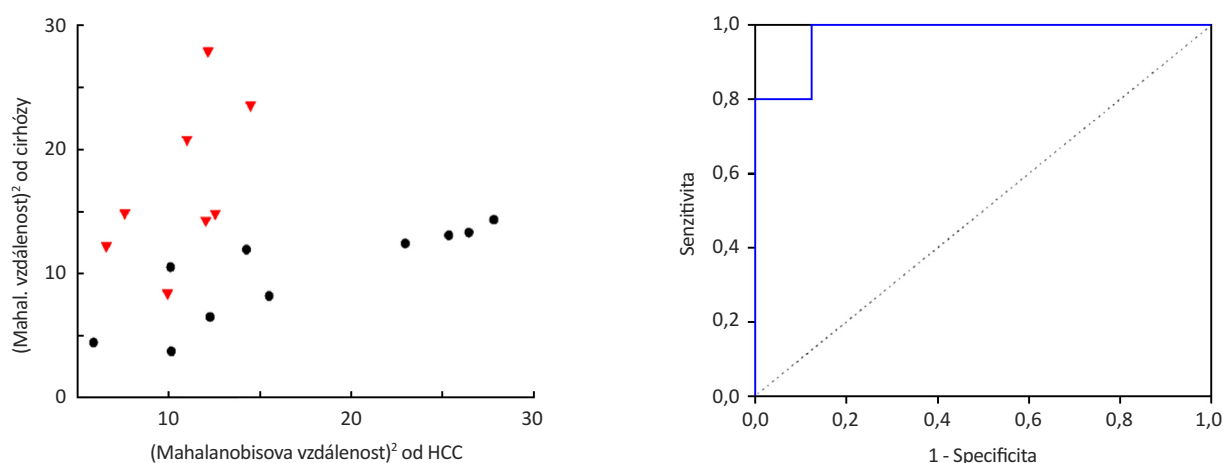
Tabulka 1. Konfuzní matice modelu LDA.

	HCC+	HCC-	celkem	% správně
HCC+	7	1	8	88
HCC-	1	9	10	90
celkem	8	10	18	89

Studie spektroskopické analýzy krevní plazmy jako možnosti diagnostiky HCC

Naší hypotézou bylo, že kombinace spektroskopických metod analýzy krevní plazmy identifikuje biomarkery jaterní karcinogeneze s dostatečnou senzitivitou a specificitou k odlišení pacientů s jaterní cirhózou s HCC a bez něj. S ohledem na literárně publikované výsledky USG surveillance HCC v tomto směru byla minimální akceptovatelná senzitivita a specificita stanovena na 65 %, respektive 75 %. Do pilotní studie bylo zařazeno celkem 18 subjektů (8 z nich s HCC). Plazma subjektů byla podrobena spektroskopické analýze čtyřmi uvedenými metodami (IČ a Ramanova spektroskopie, ECD a ROA). Získaná spektra byla zpracována multivariantní statistickou analýzou

s pomocí analýzy hlavních komponent a lineární diskriminační analýzy (LDA). Výsledky pilotního projektu dosáhly po křížové validaci velmi uspokojivé spolehlivosti vyjádřené senzitivitou 88 % a specificitou 90 % v odlišení nemocných s jaterní cirhózou bez HCC a pacientů s HCC v terénu jaterní cirhózy, ilustrováno v tabulce 1. Oblast pod křivkou ROC byla 0,975. Grafické znázornění výsledku LDA a oblasti pod křivkou ROC jsou prezentovány na obrázku 1. Nutno podotknout, že se jednalo o pacienty s pokročilejšími stadii HCC. Tento přístup byl volen s ohledem na proof of concept povahu pilotního projektu (33).



Obrázek 1. Vizualizace výsledků LDA s patrným minimálním překryvem (červeně HCC+, černě HCC-) a plocha pod křivkou ROC.

Závěr

HCC i přes veškeré léčebné pokroky zejména v oblasti systémové terapie zůstává malignitou s vysoce nepříznivou prognózou. Jen ti nemocní, u kterých je diagnostika časná, mají naději na potenciálně kurativní léčbu. Desítky let je však podíl těchto časných stadií setrvale okolo 30 %. Základní screeningovou metodou pro rizikové skupiny pacientů je ultrasonografie jater v 6měsíčních intervalech. Jedná se o metodu s četnými limitacemi a stále nedostatečnou senzitivitou pro časná stadia. Byla zkoumána řada biochemických markerů, které by umožnily zlepšit tento nepříznivý stav. Nicméně žádný z nich dosud nevykázal dostatečnou spolehlivost použitelnou pro časnou diagnostiku a tím i screening HCC. Spektroskopická analýza krevní plazmy je inovativním přístupem k tomuto problému. Již prokázala své kvality v diagnostice různých metabolických i maligních onemocnění. V oblasti HCC se může jednat o slibnou metodu i dle výsledků naší pilotní studie. V současnosti lze ale konstatovat, že biomarker, který by splňoval žádané parametry spolehlivosti pro časnou diagnostiku a screening HCC, nebyl dosud identifikován.

Funding

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic, grant nr. NV19-08-00525 and by the institutional support by the Ministry of Defense of the Czech Republic DZRVO MO1012. All rights reserved.

Conflict of interest statement

The authors state that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

Adherence to ethical standards

The clinical workplace use the informed consent, which was approved by the Ethics Committee of the Military University Hospital.

References

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-249.
2. Dušek L. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice online: Masarykova univerzita; 2018 [2022-4-23]. Available from: <http://www.svod.cz>.
3. Trinchet JC, Bourcier V, Chaffaut C, et al. Complications and competing risks of death in compensated viral cirrhosis (ANRS CO12 CirVir prospective cohort). *Hepatology.* 2015;62(3):737-750.
4. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19(3):329-338.
5. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2011;365(12):1118-1127.
6. Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, et al. Early hepatocellular carcinoma as an entity with a high rate of surgical cure. *Hepatology.* 1998;28(5):1241-1246.
7. Roayaie S, Blume IN, Thung SN, et al. A system of classifying microvascular invasion to predict outcome after resection in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2009;137(3):850-855.
8. Khalaf N, Ying J, Mittal S, et al. Natural History of Untreated Hepatocellular Carcinoma in a US Cohort and the Role of Cancer Surveillance. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2017;15(2):273-281 e1.
9. Piscaglia F, Svegliati-Baroni G, Barchetti A, et al. Clinical patterns of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic fatty liver disease: A multicenter prospective study. *Hepatology.* 2016;63(3):827-838.
10. Heimbach JK, Kulik LM, Finn RS, et al. AASLD guidelines for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2018;67(1):358-380.
11. European Association for the Study of the Liver. Electronic address eee, European Association for the Study of the L. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2018;69(1):182-236.
12. Singal A, Volk ML, Waljee A, et al. Meta-analysis: surveillance with ultrasound for early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009;30(1):37-47.
13. Masopust J, Kithier K, Radl J, et al. Occurrence of fetoprotein in patients with neoplasms and non-neoplastic diseases. *Int J Cancer.* 1968;3(3):364-373.
14. Senturk H, Cumali R. Extreme elevation of serum alpha fetoprotein in decompensated cirrhosis without HCC: an ominous sign. *Int J Biol Markers.* 2007;22(1):19-23.
15. Di Bisceglie AM, Sterling RK, Chung RT, et al. Serum alpha-fetoprotein levels in patients with advanced hepatitis C: results from the HALT-C Trial. *J Hepatol.* 2005;43(3):434-441.
16. Trevisani F, D'Intino PE, Morselli-Labate AM, et al. Serum alpha-fetoprotein for diagnosis of hepatocellular carcinoma in patients with chronic liver disease: influence of HBsAg and anti-HCV status. *J Hepatol.* 2001;34(4):570-575.
17. Kubíčková K, Hříbek P, Koula M, et al. Screening hepatocelulárního karcinomu a kvalita surveillance v reálné praxi. *Farmakoterapie* 2019;15(3):384-389.
18. Bai DS, Zhang C, Chen P, et al. The prognostic correlation of AFP level at diagnosis with pathological grade, progression, and survival of patients with hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* 2017;7(1):12870.
19. Duvoux C, Roudot-Thoraval F, Decaens T, et al. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: a model including alpha-fetoprotein improves the performance of Milan criteria. *Gastroenterology.* 2012;143(4):986-994 e3; quiz e14-5.
20. Park SJ, Jang JY, Jeong SW, et al. Usefulness of AFP, AFP-L3, and PIVKA-II, and their combinations in diagnosing hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(11):e5811.
21. Huang C, Sheng S, Sun X, et al. Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein decline after transcatheter arterial chemoembolization in patients with hepatocellular carcinoma predicts survival. *Clin Chim Acta.* 2014;431:232-238.
22. Furie B, Furie BC. Molecular basis of vitamin K-dependent gamma-carboxylation. *Blood.* 1990;75(9):1753-1762.
23. Lee W, Chung HJ, Kim S, et al. PIVKA-II is a candidate marker for monitoring the effects of the oral anticoagulant warfarin. *Clin Biochem.* 2010;43(13-14):1177-1179.
24. Nakamura S, Nouse K, Sakaguchi K, et al. Sensitivity and specificity of des-gamma-carboxy prothrombin for diagnosis of patients with hepatocellular carcinomas varies according to tumor size. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(9):2038-2043.
25. Mitchell AL, Gajjar KB, Theophilou G, et al. Vibrational spectroscopy of biofluids for disease screening or diagnosis: translation from the laboratory to a clinical setting. *J Biophotonics.* 2014;7(3-4):153-165.

26. Schipper HM, Kwok CS, Rosendahl SM, et al. Spectroscopy of human plasma for diagnosis of idiopathic Parkinson's disease. *Biomark Med.* 2008;2(3):229-238.
27. Fournier F, Guo R, Gardner EM, et al. Biological and biomedical applications of two-dimensional vibrational spectroscopy: proteomics, imaging, and structural analysis. *Acc Chem Res.* 2009;42(9):1322-1331.
28. Stovickova L, Tatarkovic M, Logerova H, et al. Identification of spectral biomarkers for type 1 diabetes mellitus using the combination of chiroptical and vibrational spectroscopy. *Analyst.* 2015;140(7):2266-2272.
29. Habartova L, Bunganic B, Tatarkovic M, et al. Chiroptical spectroscopy and metabolomics for blood-based sensing of pancreatic cancer. *Chirality.* 2018;30(5):581-591.
30. Tatarkovic M, Miskovicova M, Stovickova L, et al. The potential of chiroptical and vibrational spectroscopy of blood plasma for the discrimination between colon cancer patients and the control group. *Analyst.* 2015;140(7):2287-2293.
31. Taleb I, Thieffn G, Gobinet C, et al. Diagnosis of hepatocellular carcinoma in cirrhotic patients: a proof-of-concept study using serum micro-Raman spectroscopy. *Analyst.* 2013;138(14):4006-4014.
32. Zhang X, Thieffn G, Gobinet C, et al. Profiling serologic biomarkers in cirrhotic patients via high-throughput Fourier transform infrared spectroscopy: toward a new diagnostic tool of hepatocellular carcinoma. *Transl Res.* 2013;162(5):279-286.
33. Hříbek P, Habartová L, Kubičková K, et al. The potential of spectroscopy in the diagnosis of hepatocellular carcinoma – a pilot study. *Gastroent Hepatol.* 2021;5(75):404-409.