

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE “VICTOR BABES”
TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINA
DEPARTAMENTUL IX - CHIRURGIE I**



TEZĂ DE DOCTORAT

„miRNA in prognosticul tumorilor maligne in sfera ORL”

Coordonator Științific

PROF. UNIV. DR. HORHAT IOANA DELIA

**Timisoara
2026**

Teza urmărește dezvoltarea și evaluarea unor biomarkeri minim invazivi pentru carcinomul scuamos laringian, cu accent pe microARN-uri (miARN) circulante și derivate din vezicule extracelulare. Premisa centrală este că diagnosticul tardiv și monitorizarea imperfectă contribuie la persistența mortalității și la morbiditatea funcțională importantă, astfel încât sunt necesare instrumente complementare endoscopiei, imagisticii și confirmării histopatologice. Obiectivele sunt organizate progresiv: partea generală definește epidemiologia, factorii de risc, istoria naturală și mecanismele moleculare, iar partea specială evaluează, în cohorte pilot, semnale cantitative de miARN asociate cu boala activă și cu tranziția post-tratament. Abordarea urmărește atât identificarea markerilor cu potențial diagnostic, cât și a celor utili pentru monitorizarea răspunsului și pentru estimarea probabilității de recurență. În ansamblu, lucrarea urmărește translatarea rapidă spre aplicabilitate clinică.

Capitolul dedicat epidemiologiei, factorilor de risc și istoriei naturale sintetizează determinanții majori ai bolii și explicațiile pentru prezentarea frecvent avansată. Sunt discutate expunerile comportamentale și de mediu, cu accent pe tutun și alcool, dar și pe inhalanți ocupaționali, poluare și vulnerabilități socioeconomice care întârzie accesul la evaluare specializată. Se evidențiază faptul că simptomele pot fi nespecifice la debut (de exemplu disfonie persistentă), iar amânarea prezentării poate permite progresia de la leziuni locale la invazie și diseminare regională. Din perspectiva istoriei naturale, sunt descrise etapele de transformare malignă, evoluția clinică sub tratament și factorii care influențează controlul local și supraviețuirea. Argumentul principal este că metodele tradiționale, deși esențiale, nu sunt suficiente pentru a răspunde tuturor nevoilor de screening, triere și monitorizare, justificând explorarea biomarkerilor circulanți.

Capitolul de patogeneză moleculară integrează nivelurile genetice și epigenetice ale carcinogenezei cu rolul microambientului tumoral, descriind cum proliferarea, evitarea apoptozei, angiogeneza, adaptarea la hipoxie și remodelarea imună se consolidează reciproc. Sunt discutate dereglări ale ciclului celular, instabilitatea genomică și activarea căilor de semnalizare pro-proliferative, împreună cu mecanisme de evitare a supravegherii imune și de invazie tisulară. În continuare, capitolul despre miARN-uri în cancer și în carcinoamele scuamoase ale capului și

gâtului explică de ce aceste molecule pot fi simultan „oncogene” sau „tumor-supresoare” în funcție de ținte și de rețeaua de reglare dominată de feedback. Este subliniat că un singur miARN poate controla mai multe transcripte, iar mai multe miARN-uri pot converga asupra aceluiași proces biologic, făcând posibilă interpretarea semnăturilor multi-miARN ca indicatori de activitate tumorală și de răspuns la terapie.

Capitolul despre miARN-uri circulante și derivate din vezicule extracelulare ca biomarkeri de tip „liquid biopsy” conturează logica evaluării în două compartimente: miARN-uri libere în plasmă, care pot reflecta turnover celular și răspuns inflamator sistemic, și miARN-uri exozomale, mai stabile și posibil mai apropiate de secreția activă tumorală. Sunt discutate avantaje clinice clare: recoltare repetată, risc minim, posibilitatea de monitorizare longitudinală și integrare în fluxuri standard de laborator pentru cuantificare prin qPCR sau secvențiere. În același timp, sunt recunoscute sursele de heterogenitate metodologică, precum izolarea exozomilor, normalizarea expresiei, selecția controalelor și definirea pragurilor de clasificare. Teza folosește aceste considerații pentru a justifica alegerea unor studii pilot cu probe pereche pre-/post-tratament, deoarece această abordare reduce variabilitatea inter-individuală și permite evaluarea directă a semnalului asociat tranziției de la boală activă la control tumoral.

Studiul 1 este un studiu pilot observațional controlat care evaluează miARN-urile supraexprimate în boala activă și modificarea lor după tratament. Au fost incluși 50 de pacienți cu carcinom laringian, cu predominanță masculină (76%) și vârstă medie 60,8 ani (interval 41–82). Expunerea la tutun a fost frecventă (56% fumători activi, 30% foști fumători), iar profilul de comorbidități a inclus hipertensiune (32%), diabet zaharat tip 2 (20%) și BPOC (18%), elemente relevante pentru interpretarea semnalelor circulante. Designul a folosit probe recoltate în ferestre predefinite înainte de inițierea tratamentului și după intervenție, cu cuantificare standardizată a expresiei miARN pe platforme de tip qPCR. Compararea pre- și post-terapie a urmărit identificarea markerilor care se reduc odată cu scăderea activității tumorale, ceea ce ar susține rolul lor în monitorizarea răspunsului.

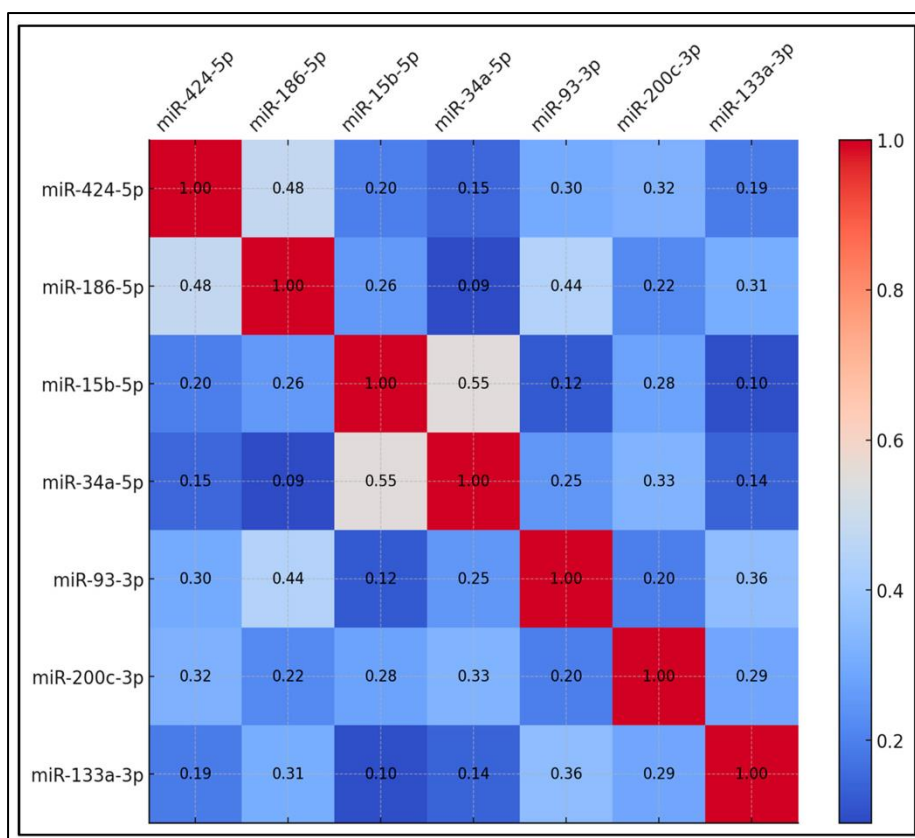


Figure 1 – Matricea de corelație pentru miARN-urile circulante supraexprimate.

Rezultatele Studiului 1 au evidențiat șapte miARN-uri cu niveluri mai mari în pretratament și scădere după controlul tumoral, sugerând utilitate pentru monitorizarea răspunsului. Cel mai pronunțat semnal a fost miR-424-5p, cu fold change 4,59 (ΔCt -2,8 pretratament versus -0,6 posttratament) și $p = 0,0091$. MiR-186-5p a avut fold change 2,19 (ΔCt 0,19 versus 1,32) și $p = 0,003$. Alte ținte semnificative au inclus miR-15b-5p (fold change 1,77; $p = 0,0057$), miR-34a-5p (1,54; $p = 0,02$), miR-93-3p (1,33; $p = 0,015$) și miR-126-3p (1,22; $p = 0,04$), în timp ce miR-155-5p a arătat o tendință fără semnificație statistică (fold change 1,13; $p = 0,08$). Evaluarea ROC a sugerat performanță discriminativă pentru miR-424-5p (AUC 0,82) și miR-186-5p (AUC 0,79), compatibilă cu un rol de marker de monitorizare în setări clinice.

Analizele de corelație din Studiul 1 au arătat că semnătura de miARN-uri supraexprimate nu este aleatorie, ci include relații moderate care sugerează rețele biologice parțial comune. Cea mai puternică asociere a fost între miR-15b-5p și miR-34a-5p ($r = 0,55$, $p < 0,01$), iar miR-424-5p s-a corelat cu miR-186-5p ($r = 0,48$, $p <$

0,05). MiR-186-5p a avut, de asemenea, o corelație moderată cu miR-93-3p ($r = 0,44$, $p < 0,05$), în timp ce alte perechi au avut corelații mici până la moderate (aproximativ $r = 0,09–0,33$), sugerând co-reglare limitată sau influențe biologice distincte. Interpretarea a susținut ideea că markerii pot reflecta atât procese suprapuse (de exemplu proliferare și stres celular), cât și componente diferite ale microambientului tumoral. În termeni practici, aceste corelații au fost tratate ca argument pentru modele multi-miARN, unde combinarea semnalelor ar putea îmbunătăți robustetea clasificării față de utilizarea unui singur marker.

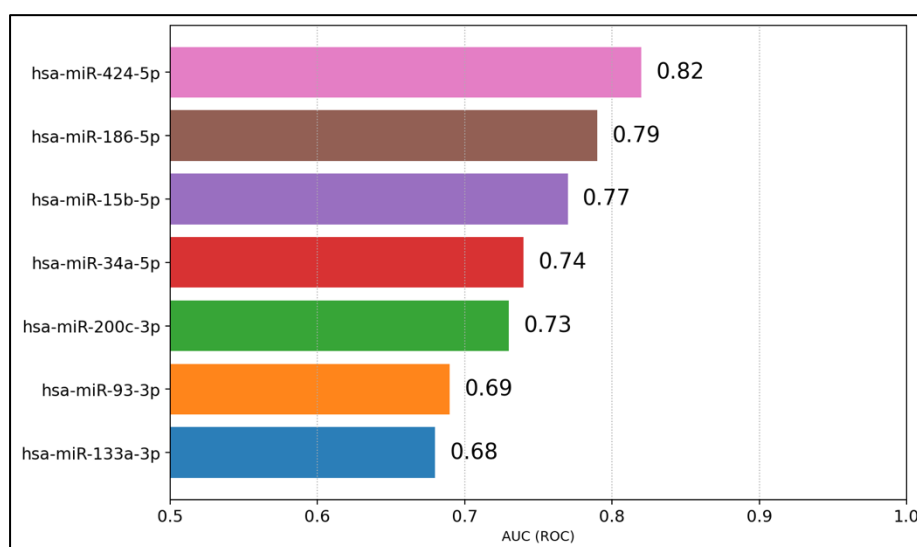


Figure 2 –MiARN-uri circulante supraexprimate în cancerul laringian.

Studiul 2 investighează miARN-urile subexprimate în boala activă și creșterea lor relativă după tratament, ca indicatori ai recuperării unui control tumor-supresiv. Au fost analizați 30 de pacienți cu probe pereche, iar pool-urile (trei pretratament și trei posttratament) au fost procesate cu strategii de normalizare concordante, cu variabilitate tehnică controlată (coeficient de variație sub 12% între pool-uri). Au fost selectate șapte miARN-uri cu fold change sub 0,40 și $p < 0,05$, sugerând scădere relevantă pretratament și revenire post-tratament. MiR-107 a avut fold change 0,20 (ΔCt 2,95 versus 0,62; $p = 0,002$), iar let-7a-5p fold change 0,26 (ΔCt 2,44 versus 0,50; $p = 0,006$), semnale compatibile cu dereglare semnificativă în boala activă. Au mai fost observate scăderi pentru miR-99a-5p (0,29; $p = 0,01$), miR-125b-5p (0,34; $p = 0,02$), miR-145-5p (0,37; $p = 0,03$), miR-195-5p (0,39; $p = 0,04$) și miR-30a-5p (0,38; $p = 0,04$). Prin această direcție, teza a propus o logică de monitorizare bazată

pe „creșterea” markerilor tumor-supresori odată cu controlul bolii.

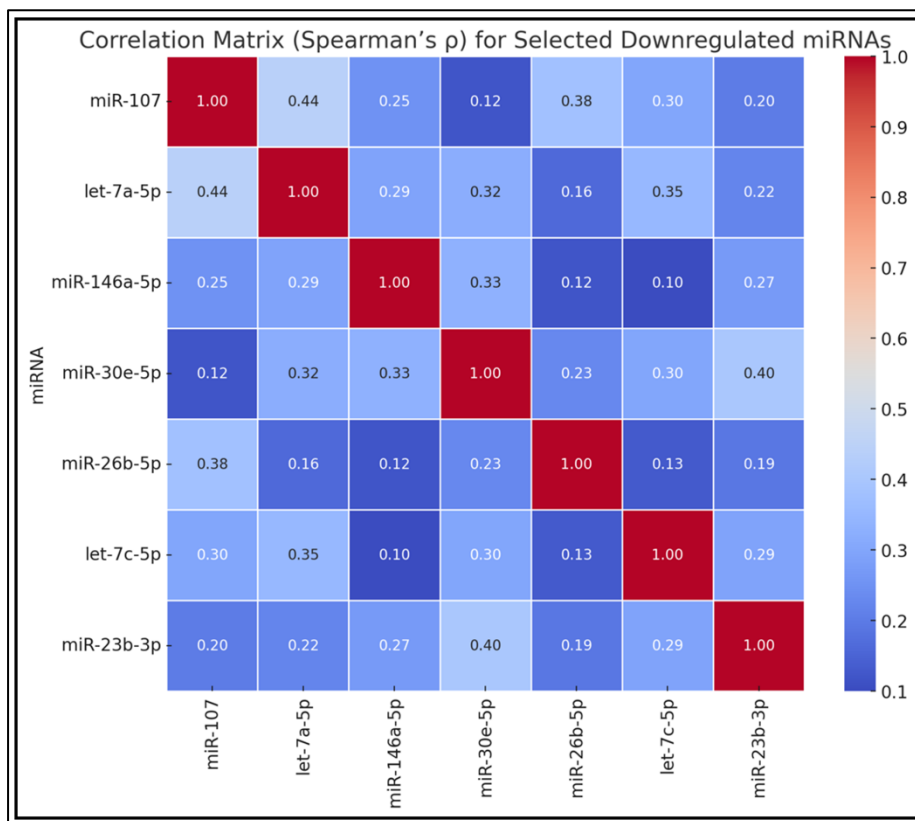


Figure 3 – Correlation matrix for selected downregulated miRNAs.

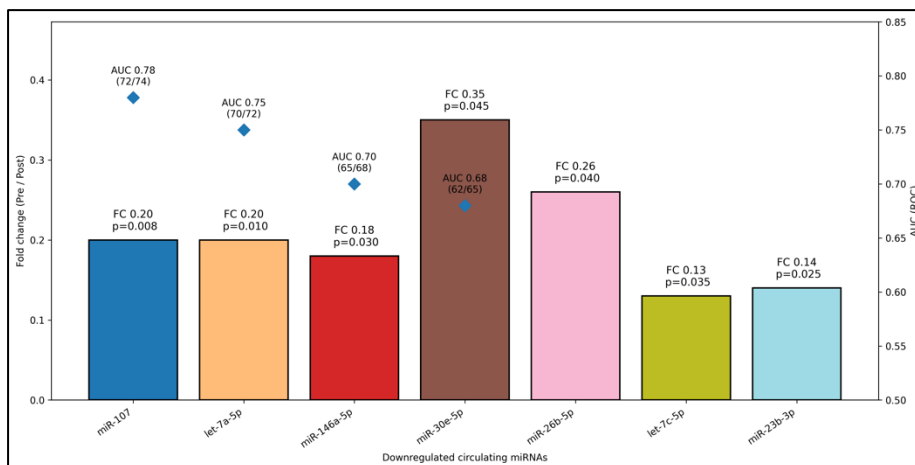


Figure 4 – Matricea de corelație pentru miARN-urile selectate subexprimite.

Studiul 3 realizează o sinteză narativă și un „evidence map” al miARN-urilor exozomale în carcinomul scuamos laringian, folosind criterii PRISMA 2020 și instrumente standard de evaluare a riscului de bias pentru acuratețe diagnostică și

evidență observațională. Căutările au acoperit PubMed/MEDLINE, Web of Science și Scopus până la 1 iunie 2025 și au identificat nouă studii eligibile (2014–2024), toate din aceeași zonă geografică, împărțite în două studii clinice serice de tip caz–control și șapte studii mecanistice sau de profilare în modele celulare. Sinteza a evidențiat heterogenitate a metodelor de izolare și cuantificare, precum și lipsa unor praguri prespecificate și validate extern pentru clasificarea caz/control. Totuși, semnalele raportate au sugerat acuratețe diagnostică promițătoare în cohortele clinice disponibile, cu AUC de ordinul 0,80–0,88 pentru anumite combinații sau analite unice, dar fără posibilitatea unei meta-analize robuste din cauza variației metodologice și a numărului mic de studii comparabile. Concluzia principală a fost că domeniul este biologic plauzibil și clinic relevant, însă insuficient matur pentru adoptare clinică fără standardizare.

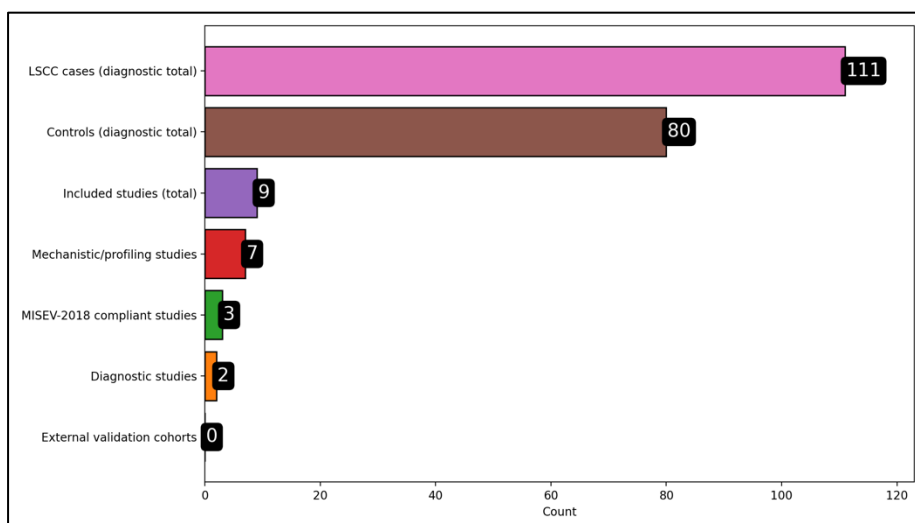


Figure 5 – ARN-urile necodante derivate din exozomi în carcinomul scuamos laringian.

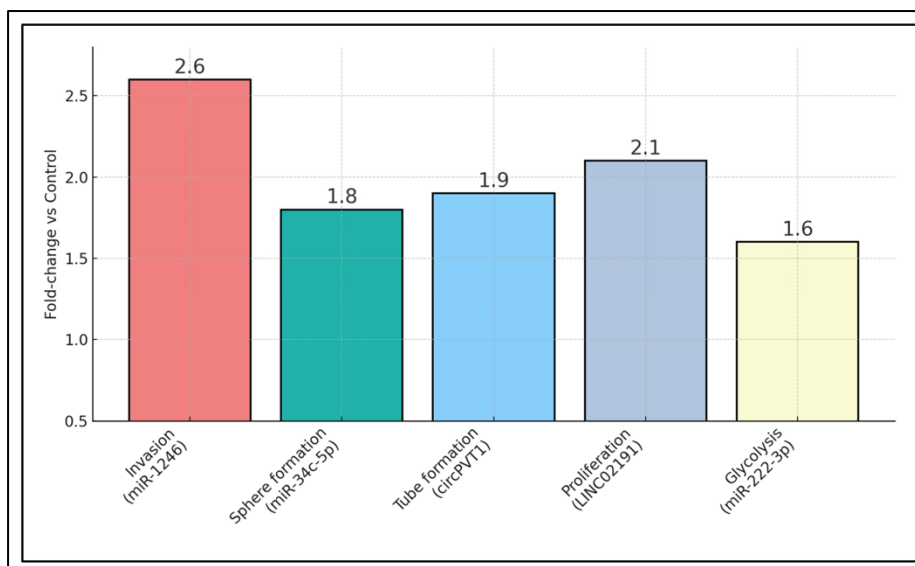


Figure 6 – Modificări de tip fold-change în testele mecanistice pentru cargo-urile exozomale.

Concluziile finale integrează partea experimentală și sinteza dovezilor într-un model unitar: miARN-urile circulante se modifică în mod consecvent între boala activă și perioada precoce post-terapeutică, iar semnalele „în sus” și „în jos” sunt complementare. Ca rezultate centrale, miR-424-5p (fold change 4,59; AUC 0,82) și miR-186-5p (fold change 2,19; AUC 0,79) sunt propuse ca markeri supraexprimați în boala activă care scad după terapie, în timp ce miR-107 (AUC 0,78; sensibilitate 72%; specificitate 74%) și let-7a-5p (AUC 0,75; sensibilitate 70%; specificitate 72%) sunt propuse ca markeri subexprimați care cresc odată cu controlul bolii. Teza subliniază că, în ciuda limitărilor inerente studiilor pilot (dimensiune redusă, variabilitate biologică și necesitatea validării externe), rezultatele susțin fezabilitatea unei strategii de monitorizare prin „liquid biopsy” bazată pe paneluri de miARN. Direcțiile recomandate includ cohorte prospective multicentrice, praguri prespecificate, standardizare a izolării exozomilor și integrarea markerilor moleculari cu parametri clinici pentru a îmbunătăți decizia terapeutică și supravegherea post-tratament.

**“VICTOR BABES” UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY
TIMISOARA
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT IX SURGERY I**



DOCTORAL THESIS

**“miRNAs as Prognostic Biomarkers in Head and Neck
Malignancies”**

Scientific Coordinator
HORHAT IOANA DELIA MD, PHD, DR. HAB

**Timisoara
2026**

The thesis examines laryngeal squamous cell carcinoma as a disease in which delayed diagnosis, anatomical constraints, and biological heterogeneity contribute to persistent morbidity and mortality, and it argues that minimally invasive molecular markers could meaningfully complement established clinical workflows. The general part frames this rationale by reviewing epidemiology, risk-factor patterns, and natural history, then consolidating genetic, epigenetic, and microenvironmental drivers that shape malignant transformation and progression. It further positions microRNAs as attractive candidates because they are stable in biofluids, quantifiable with sensitive platforms, and biologically linked to pathways relevant to proliferation, apoptosis, invasion, angiogenesis, and immune modulation. The discussion emphasizes that miRNA signals may be captured in both freely circulating fractions and extracellular vesicle compartments, with exosomes offering additional protection and potential tumor specificity due to regulated cargo packaging. Across the general chapters, the narrative converges on a translational premise: if circulating and vesicle-derived miRNA trajectories reliably track disease activity and response to therapy, they could enable earlier detection, refine risk stratification, and support response monitoring in settings where repeated invasive sampling is impractical.

Study 1 is designed as a controlled, exploratory observational pilot that targets circulating and exosome-associated microRNAs expected to be upregulated in active laryngeal cancer. The approach relies on paired sampling before and after definitive therapy to detect treatment-responsive shifts that could serve as monitoring signals rather than static case–control differences. Fifty patients with histopathologically confirmed laryngeal carcinoma were enrolled at a municipal ENT clinic in Timișoara under institutional ethical oversight and informed consent. A subset of 30 patients provided paired pre-treatment and post-treatment blood samples, yielding 60 samples that were pooled into six pools of ten specimens (three pre-treatment pools and three post-treatment pools). Pre-treatment sampling was aligned with the active disease period immediately prior to therapy initiation, and post-treatment sampling was standardized to a 2–4 week window after treatment completion to reduce acute peri-procedural noise while capturing early molecular shifts. Plasma processing, exosome isolation, small-RNA extraction, reverse transcription, and qPCR were executed with

multiple internal and external quality controls and multi-reference normalization to reduce dependence on any single housekeeping target.

The clinical profile of Study 1 provides context for interpreting circulating microRNA patterns and mirrors commonly reported risk and presentation features in laryngeal malignancy. The cohort was predominantly male (76%) with a mean age of 60.8 years, spanning 41 to 82 years, consistent with the typical demographic distribution for this tumor. Tobacco exposure was highly prevalent: 56% of participants were current smokers and 30% were former smokers, supporting the importance of sustained carcinogenic exposure in shaping both disease burden and systemic molecular signals. Comorbidity patterns reflected substantial cardiometabolic and respiratory load, including hypertension (32%), type 2 diabetes (20%), and COPD (18%), with smaller proportions reporting ischemic heart disease (10%) and dyslipidemia (8%). Tumor staging was skewed toward advanced disease, with stage III in 30% and stage IV in 34%, while stage II represented 22% and stage I for 14%, reinforcing the thesis premise that earlier detection remains an unmet need. Anatomically, glottic tumors predominated (60%), followed by supraglottic (32%) and subglottic lesions (8%). Treatment allocation included non-surgical modalities (60%) and surgery (40%), with surgical approaches distributed between total and partial laryngeal procedures.

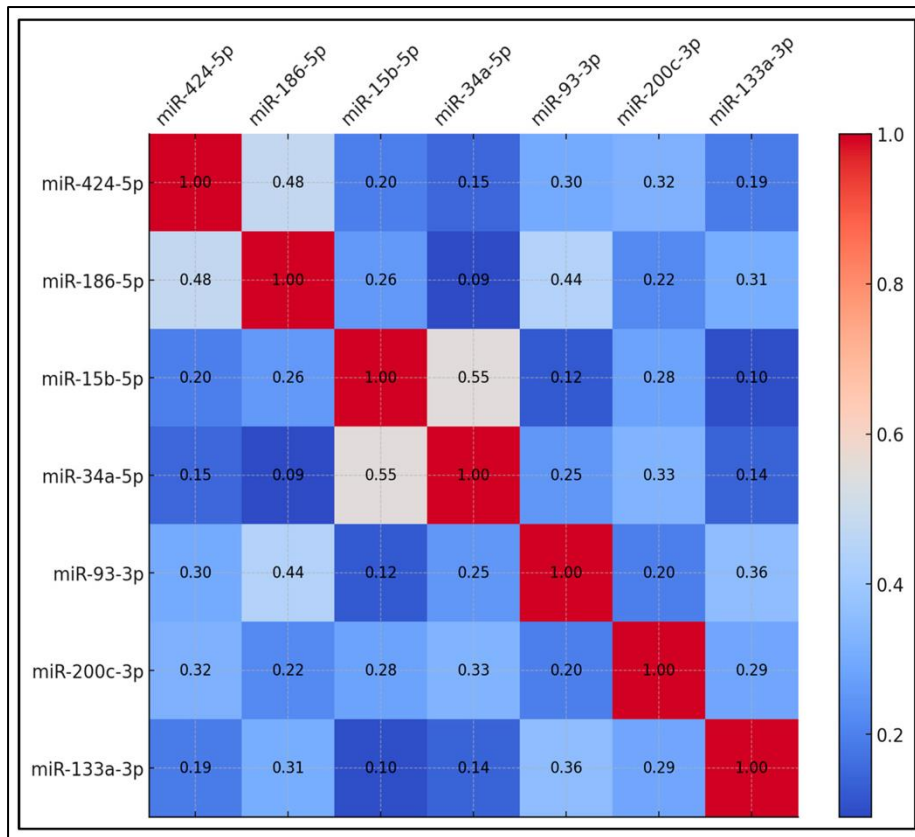


Figure 1 – Correlation matrix for upregulated circulating miRNAs.

Study 1 identifies a panel of microRNAs that are higher in the pre-treatment state and decrease after therapy, supporting their candidacy as dynamic indicators of tumor activity. The strongest differential signal was miR-424-5p, with mean ΔCt shifting from -2.8 pre-treatment to -0.6 post-treatment, corresponding to a fold change of 4.59 and a statistically significant p-value of 0.0091. A second leading candidate, miR-186-5p, showed mean ΔCt values of 0.19 pre-treatment and 1.32 post-treatment, with a fold change of 2.19 and $p = 0.003$, again indicating a marked reduction after tumor control. Additional treatment-responsive candidates included miR-15b-5p (fold change 1.77, $p = 0.0057$), miR-34a-5p (fold change 1.54, $p = 0.02$), miR-93-3p (fold change 1.5, $p = 0.04$), miR-200c-3p (fold change 2.0, $p = 0.023$), and miR-133a-3p (fold change 1.92, $p = 0.035$). The directionality across these markers is internally consistent: elevation during active disease followed by decline after treatment, implying potential usefulness for early response assessment and short-interval post-therapy surveillance.

Study 1 further evaluates whether these upregulated markers behave as a

coordinated signature, an essential step for building reliable multi-analyte panels. Correlation analysis in pre-treatment samples showed moderate, statistically supported relationships that suggest shared regulation or convergent tumor-related drivers. The strongest significant association was between miR-15b-5p and miR-34a-5p ($r = 0.55$, $p < 0.01$). Additional significant correlations included miR-424-5p with miR-186-5p ($r = 0.48$, $p < 0.05$) and miR-186-5p with miR-93-3p ($r = 0.44$, $p < 0.05$), while other pairings ranged lower, reflecting partial modularity rather than a single tightly coupled cluster. Diagnostic discrimination was assessed using ROC analysis: miR-424-5p achieved an AUC of 0.82 (95% CI 0.70–0.94) with sensitivity 78% and specificity 80%, and miR-186-5p achieved an AUC of 0.79 (95% CI 0.66–0.92) with sensitivity 74% and specificity 78%. Logistic regression further supported independent predictive contributions, with miR-424-5p showing an odds ratio of 1.56 (95% CI 1.16–2.22, $p = 0.010$) and miR-186-5p an odds ratio of 1.32 (95% CI 1.07–1.68, $p = 0.034$), and the combined model reaching overall classification accuracy of approximately 82%.

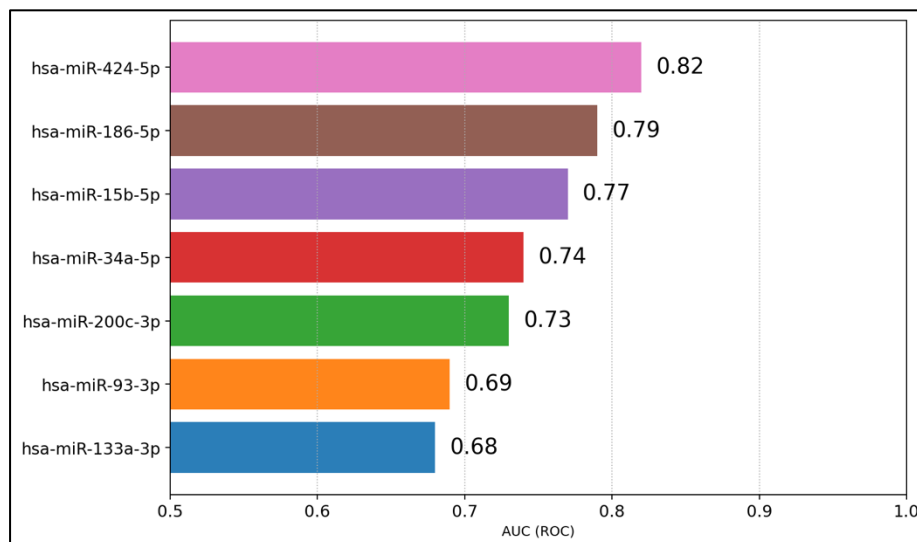


Figure 2 – Upregulating circulating miRNAs in laryngeal cancer (effect size).

Study 2 is structured as a complementary pilot that concentrates on microRNAs that are lower during active disease and increase after therapy, reflecting a hypothesized loss and partial restoration of tumor-suppressive regulatory tone. Thirty adults with histologically confirmed laryngeal squamous cell carcinoma were prospectively enrolled, and each provided paired blood specimens collected immediately before treatment initiation and again two to four weeks after completion

of therapy. As in Study 1, pooling was used to increase feasibility and reduce the impact of extreme outliers at the discovery stage: every ten individual samples were combined into one pooled specimen, generating three pre-treatment pools and three post-treatment pools that functioned as biological replicates for comparison. Plasma separation and storage were standardized, and exosome isolation followed a multi-step workflow including ultracentrifugation and a subsequent purification step to enhance vesicle recovery and reduce contaminants. RNA extraction targeted small-RNA fractions from both cell-free plasma and exosomal compartments, followed by reverse transcription and qPCR quantification using a broad panel of cancer-relevant miRNAs. Extensive controls (including spike-ins and inter-plate calibrators) were used to verify extraction, reverse transcription, and amplification consistency, supporting the interpretability of downregulation signals as biological rather than technical.

Study 2 results demonstrate a consistent pattern of suppression in the pre-treatment state for seven microRNAs meeting predefined criteria for downregulation (fold change below 0.40 with $p < 0.05$), with stable trends across normalization strategies and reported coefficient of variation below 12% across pools. The most prominent candidates were miR-107 and let-7a-5p, both showing fold changes near 0.20 and statistically supported shifts. miR-107 displayed mean ΔC_t values of 3.48 pre-treatment versus 1.18 post-treatment, fold change 0.20, $p = 0.008$, indicating an approximate 80% relative suppression during active disease. let-7a-5p showed mean ΔC_t values of 2.05 pre-treatment versus -0.30 post-treatment, fold change near 0.20, $p = 0.01$, consistent with a marked rebound after therapy. Additional downregulated miRNAs included miR-146a-5p (fold change 0.18, $p = 0.03$), miR-30e-5p (fold change 0.35, $p = 0.045$), miR-26b-5p (fold change 0.26, $p = 0.04$), let-7c-5p (fold change 0.13, $p = 0.035$), and miR-23b-3p (fold change 0.14, $p = 0.025$). ROC analysis supported clinically meaningful discrimination for the leading markers: miR-107 achieved AUC 0.78 (95% CI 0.62–0.90) with sensitivity 72% and specificity 74% ($p = 0.005$), and let-7a-5p achieved AUC 0.75 (95% CI 0.59–0.87) with sensitivity 70% and specificity 72% ($p = 0.01$).

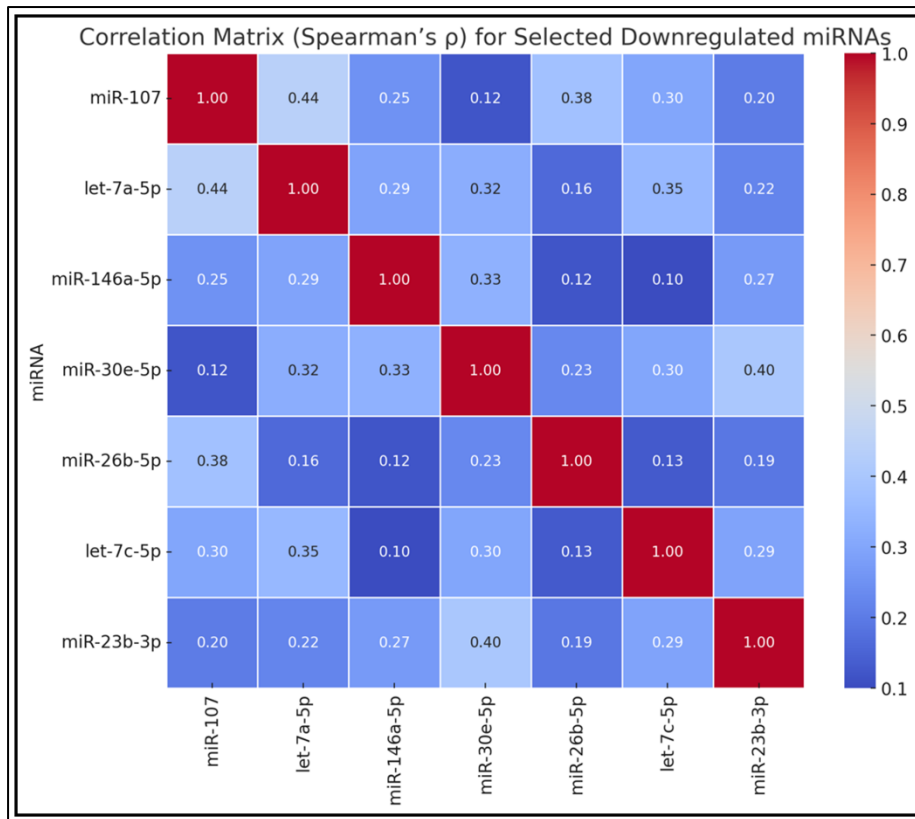


Figure 3 – Correlation matrix for selected downregulated miRNAs.

Study 2 interpretation highlights that downregulated markers also show partial co-movement, supporting a module-like signature suitable for multi-marker modeling and potentially more stable monitoring. Correlation analysis found moderate positive associations such as miR-107 with let-7a-5p ($r = 0.44$, $p < 0.05$), miR-107 with miR-26b-5p ($r = 0.38$, significant), let-7a-5p with let-7c-5p ($r = 0.35$), and miR-30e-5p with miR-23b-3p ($r = 0.40$, $p < 0.05$), while some pairs were weaker and non-significant, implying that several distinct biological drivers may underlie the overall suppression pattern. Logistic regression quantified inverse associations with pre-treatment status: miR-107 showed an odds ratio of 0.54 (95% CI 0.34–0.85, $p = 0.012$), and let-7a-5p showed an odds ratio of 0.62 (95% CI 0.40–0.94, $p = 0.027$), indicating that higher expression reduces the likelihood of classification as active, untreated disease. Joint inclusion of miR-107 and let-7a-5p improved classification accuracy by approximately 8% compared with single-marker models and showed low collinearity (variance inflation factors below 1.6), suggesting complementary predictive value. Conceptually, the pre-treatment suppression and post-treatment rebound are interpreted as treatment-responsive restoration of regulatory networks; practically, the pattern

supports development of composite panels that integrate both upregulated and downregulated markers to improve resilience across heterogeneous clinical states.

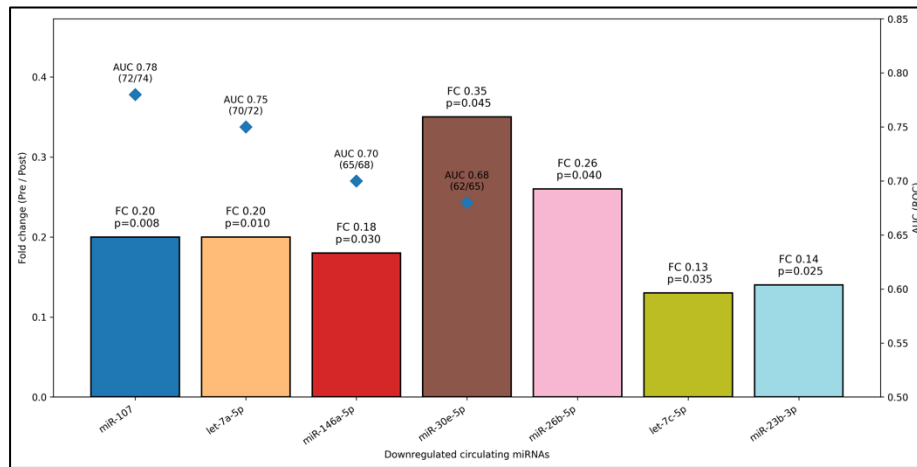


Figure 4 – Downregulated circulating miRNAs.

Study 3 extends the thesis from primary measurement to field-level synthesis by mapping the evidence for exosome-derived microRNAs and other exosomal non-coding RNAs as liquid-biopsy biomarkers in laryngeal squamous cell carcinoma. The review is structured around PRISMA 2020 principles and a PICO framework and searches PubMed/MEDLINE, Web of Science, and Scopus through 1 June 2025, with reference checking, forward citation screening, and trial-registry review. Duplicate screening and extraction are described alongside formal risk-of-bias assessment using QUADAS-2 for diagnostic studies and ROBINS-I for prognostic or mechanistic observational evidence. Nine eligible studies published between 2014 and 2024 are synthesized, all originating from mainland China and dividing into two serum case–control diagnostic cohorts and seven mechanistic or profiling studies. Reported clinical discrimination includes an AUC of 0.876 (95% CI 0.80–0.94) with sensitivity 94.2% and specificity 73.5% for a dual exosomal RNA panel, and an AUC of 0.797 with sensitivity 82% and specificity 70% for a single exosomal miRNA model using a specified ΔCt cut-off. Mechanistic studies describe measurable phenotypes, including immune polarization linked to a 2.6-fold invasion increase in co-culture assays, stromal vesicle effects such as 1.8-fold increases in tumor-sphere formation under depleted tumor-suppressive cargo, angiogenesis readouts with roughly 1.9-fold increases in endothelial tube formation, and metabolic rewiring with ECAR increases around 1.6-fold. The synthesis emphasizes that heterogeneity of isolation methods

and reporting standards prevents pooled estimates and necessitates an evidence-mapping approach.

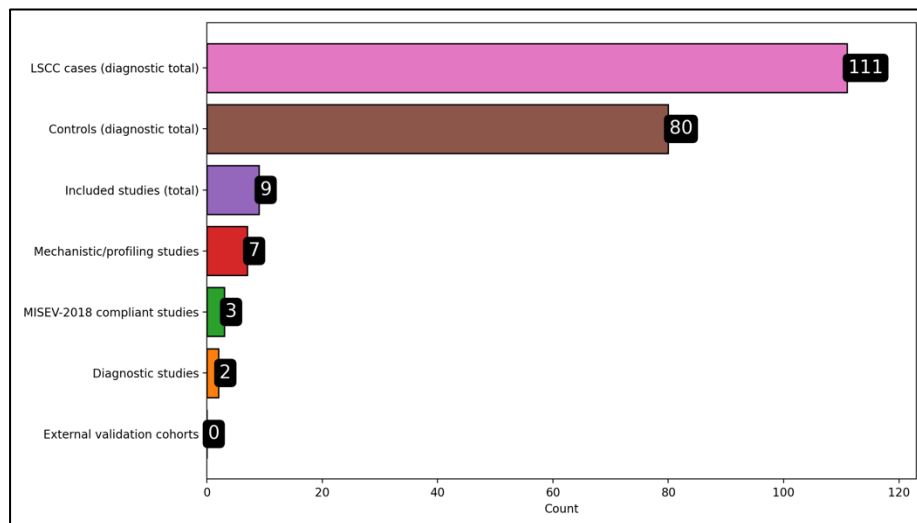


Figure 5 – LSCC exosome-derived ncRNA evidence base.

The final synthesis integrates the empirical pilots and the evidence map into a coherent argument that circulating and exosomal microRNA dynamics can capture complementary facets of disease activity and early remission in laryngeal cancer. Across the primary studies, one signature comprises microRNAs higher during active disease that decrease after therapy, exemplified by miR-424-5p (fold change ~ 4.59 ; AUC ~ 0.82) and miR-186-5p (fold change ~ 2.19 ; AUC ~ 0.79), while a second signature comprises microRNAs suppressed during active disease that rebound after therapy, exemplified by miR-107 (fold change ~ 0.20 ; AUC ~ 0.78) and let-7a-5p (fold change ~ 0.20 ; AUC ~ 0.75). Moderate intra-panel correlations in both directions (e.g., $r \sim 0.55$ among key upregulated markers and $r \sim 0.44$ among leading downregulated markers) support the practical conclusion that panels are likely more stable than single analytes. Modeling results reinforce this point by demonstrating incremental gains in classification when markers are combined (with accuracy around 82% in the upregulated model and an approximate 8% improvement for combined downregulated predictors compared with single-marker models). The evidence map adds a broader translational frame: exosomal signals can show strong study-level discrimination (AUCs around 0.80–0.88 in the best reported models) and mechanistic plausibility, but methodological heterogeneity, limited geographic diversity, and risk-of-bias concerns constrain generalizability and preclude pooled accuracy synthesis.

Overall, the thesis concludes that miRNA-based liquid biopsy is feasible and biologically informative for laryngeal cancer, while emphasizing that rigorous standardization, prespecified thresholds, individual-level validation, and prospective multi-center cohorts are required before routine clinical deployment.

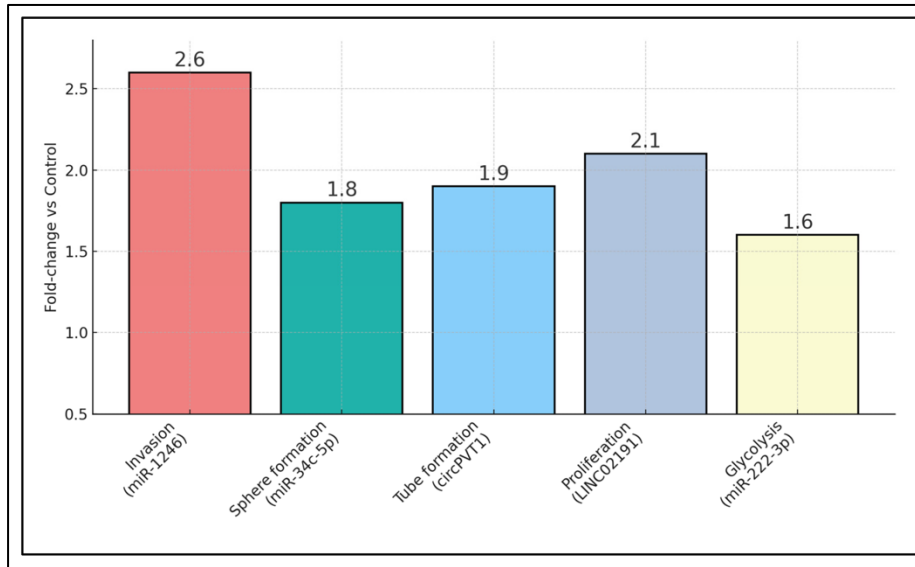


Figure 6 – Mechanistic assay fold-changes across exosomal cargos.