

**ADVANCING 3D MODULAR CELL CULTURE PLATFORMS:  
EXPLORING VASCULARIZATION AND IN-SITU  
ELECTROCHEMICAL PROTEIN MARKER DETECTION.**

**MANLEEN KAUR**



**CENTRE FOR BIOMEDICAL ENGINEERING  
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI  
MAY 2025**

©Indian Institute of Technology Delhi (IITD), New Delhi, 2025

# **Advancing 3D Modular Cell Culture Platforms: Exploring Vascularization and In-situ Electrochemical Protein Marker Detection.**

by

**MANLEEN KAUR**

Submitted

*In fulfilment of the requirements for the degree of*

**DOCTOR OF PHILOSOPHY**

*to the*



**Centre for Biomedical Engineering**

**INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY, DELHI**

**MAY 2025**

*Dedicated to my father, mother and  
my brother*

## CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled '**Advancing 3D Modular Cell Culture Platforms: Exploring Vascularization and *In-situ* Electrochemical Protein Marker Detection**' being submitted by **Ms. Manleen Kaur** to the Indian Institute of Technology Delhi for the award of the degree of **Doctor of Philosophy** is a record of bonafide research work carried out by her. **Ms. Manleen Kaur** has worked under my guidance and supervision and has fulfilled the requirements for the submission of the thesis, which to our knowledge has reached the requisite standard.

The results contained in this thesis are original and have not been submitted, in part or full, to any other University or Institute for the award of any other degree or diploma.

**Dr. Neetu Singh**  
Centre for Biomedical Engineering  
Indian Institute of Technology Delhi,  
Hauz Khas, New Delhi-110016  
India



## ACKNOWLEDGMENTS

*“Every end is a new beginning.” As I conclude this significant chapter of my academic journey, I reflect on the countless memories, challenges, and invaluable support that have shaped this experience. This thesis stands as a testament to the collective effort and unwavering support of many individuals.*

*Firstly, I express my deepest gratitude to my supervisor, Prof. Neetu Singh. Her consistent guidance has been a beacon of knowledge, steering me towards academic and personal growth. Prof. Singh's patience, understanding and insightful feedback throughout the research process have been invaluable. Her encouragement fostered an environment of intellectual freedom and creativity. She was always open to hearing even my smallest concerns and skillfully guided our discussions to productive outcomes. Time was never a barrier; I remember often sharing the results at midnight and she was always ready for meaningful discussions regardless of time. Her approachability and readiness greatly advanced my research. I am immensely thankful for her belief in my capabilities and her instrumental role in my development as a researcher.*

*I am grateful to my doctoral committee members Dr. Jayanta Bhattacharya, Dr. Sameer Sapra, and Dr. Vivekanandan Perumal. Their guidance and motivation throughout these years have been invaluable. I look forward to receiving their wisdom beyond this thesis. I also thank the central research facilities at IIT Delhi for maintaining exceptional facilities and accessibility. I am thankful to Dr. Savneet Kaur at the Institute of Liver and Biliary Sciences (ILBS) for the trust and the time she invested in my work.*

*My gratitude extends to my professors and lecturers whose teachings have immensely enriched my knowledge base. I spent significant time in the laboratory, which became a foundation for laughter, deep scientific discussions, and comfort, thanks to my seniors, colleagues, and juniors. I thank Dr. Tejinder Kaur, Dr. Shweta, Dr. Akshay Joshi, and Dr. Simran Kaur Rainu for helping and enhancing my scientific skills. My colleague Anju deserves special mention for her support during the first year of my stressful times. I am thankful to my colleague Namrata Tiwari for the last few months. Our gossip time somehow became a memorable part of this journey. I thank my junior Rupal Sarup for support and trust during the mid years of this journey and Nitish Kumar for his assistance. I would also like to extend my heartfelt thanks to Somya, my junior colleague, for those precious chai breaks where we talked about all scientific and nonscientific things and the playful banter. I am thankful to my batchmate, Harshdeep Kaur, for their constant encouragement, metro talks and companionship throughout this*

*journey. My college friends, high school friends, and cousins have been a source of unwavering support and joy, celebrating each milestone with me.*

*Dr. Shreemoyee De deserves a special mention for her transition from the role of a senior to a mentor and confidant. Her transformation from a strict senior to my trusted advisor and source of emotional support was both surprising and deeply cherished. Our conversations, whether about research or personal challenges, have left an indelible mark on my experience. Her support during my most challenging times was crucial, offering joyful breaks that helped me navigate through failed experiments and maintain my mental and emotional well-being.*

*A special note of gratitude to Dr. Raghav Jain, with whom the journey to pursue PhD began, business confidant, and a friend of thirteen years who has witnessed every shade of my journey. Thank you for being the one constant through the chaos—from scientific rants and failed experiments to long-winded whining about lab life, personal struggles, and everything in between. You patiently absorbed every frustrated sigh, every angry outburst, and every moment of doubt. Your presence made this journey not just bearable, but meaningful. I'm deeply grateful for your unwavering support, your practicality in crisis, and the quiet friendship that never asked, but always stayed.*

*Finally, I acknowledge the cornerstone of my life, my father for his unwavering support in my life. His endless encouragement and love have been the bedrock of my journey. His belief in my abilities and his constant presence provided the strength I needed to persevere through challenges. His support was not just emotional but also intellectual, often providing insights that guided my research directions. His role in my life extends beyond familial ties; he is my mentor, supporter, and a constant source of inspiration. He has always been in my driving force. Special thanks to my mother and brother. Thank you for giving me tension free five long years and for standing by me through every phase of this journey. I owe to my younger brother, who, through every sibling fight, shared laugh, and late-night giggle, unknowingly became the calm in my PhD storm. You made home a safe haven, where I could be a tired sister and not a struggling researcher. I'll always cherish the way you stood by me, even without knowing that you did. To my mother, whose strength stood taller than the endless societal questions—thank you for shielding me with unwavering belief. While the world questioned, you answered with grace. While I doubted, you encouraged with quiet courage. Even when the weight of my journey brought you silent stress, you never let it reach me. Your resilience gave me wings to chase this dream, and your sacrifices became the invisible thread that held me together. Home was never just a place—it was you too, making the weight of deadlines a little lighter and the*

*silence of stress a little louder with your antics. Your presence and encouragement have always been a beacon of belief in myself.*

*With this, I mark the end of this journey and the onset of new beginnings.*

*Manleen Kaur*

## ABSTRACT

Liver diseases are a major global health concern, significantly contributing to the mortality rates worldwide. According to the World Health Organization, liver diseases result in approximately 2 million deaths per year globally. Among the myriad complications associated with liver diseases, cirrhosis and its consequent susceptibility to bacterial sepsis are particularly lethal. Bacterial sepsis in cirrhotic patients has a mortality rate up to five times higher than that in non-cirrhotic patients with sepsis. The diagnostic challenges posed by the onset of bacterial sepsis in liver cirrhosis patients are severe due to the inadequacies of traditional diagnostic methods. These methods, which include culture-based or molecular tests such as polymerase chain reaction (PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), are often slow and fail to meet the urgent need for rapid and accurate diagnosis necessary for effective early intervention. Recognizing these challenges, this thesis introduces innovative diagnostic and therapeutic advancements through the development of a 3D *in-vitro* platform designed specifically for liver diseases. The research utilizes advanced microgel technologies combined with electrochemical techniques to enhance the rapid detection and precise quantification of protein biomarkers in plasma, particularly for liver cirrhotic patients. This doctoral work covers several chapters. Each chapter builds on the idea of improving and taking up a step closer to true point-of-care sepsis diagnostics. The work also enhances understanding of liver pathophysiology through advanced bioengineering approaches.

**Chapter 1** sets the foundational knowledge and urgency for the development of a new diagnostic platform by reviewing the critical limitations of existing methods in the timely detection of sepsis, particularly in cases of liver cirrhosis. It highlights the need for rapid diagnostics that can surpass the limitations of current culture-based and molecular diagnostic techniques, which are often too slow to facilitate timely therapeutic interventions. **Chapter 2** discusses the development of a non-invasive, rapid electrochemical sensing platform tailored specifically for the detection of bacterial sepsis in liver cirrhotic patients. This platform integrates microgels with electrochemical sensors to capture and detect bacterial growth dynamically and accurately. By utilizing cyclic voltammetry, this system reads the redox changes with the help of carbon nano dots co-encapsulated in microgels. The redox changes are caused by bacterial growth over time which gets recorded by the carbon nanodots. The optimized platform significantly reduces the time required for diagnosis from days to mere hours. The chapter presents validation results using clinical samples from liver cirrhotic patients, demonstrating the platform's effectiveness in real-world settings. **Chapter 3** expands

the functionality of the electrochemical sensing platform developed in the previous chapter by incorporating a multiplexed approach capable of detecting both host and pathogen biomarkers simultaneously. This chapter emphasizes the importance of detecting host inflammatory markers such as Procalcitonin (PCT), Interleukin-6 (IL-6), and C-reactive protein (CRP), alongside pathogen markers like lipopolysaccharide (LPS), to provide a comprehensive diagnostic profile. This enhanced capability allows for more accurate and timely clinical decision-making, leveraging the platform's increased sensitivity and specificity to surpass traditional diagnostic methods like ELISA.

Further, to obtain better understanding of the role of sepsis associated host and pathogen protein markers, the co-relation between the markers and disease progression is a must. This understanding will provide important host information like cell-interactions and cell-stiffness. Therefore, **Chapter 4** focuses on developing a dynamic, modular hepatocyte co-culture platform that more accurately mimics the physiological conditions of the liver. This microgel-based modular system is designed to allow precise control over cell-cell and cell-matrix interactions, essential for studying liver infections and the inherent cellular functionality critical to liver health. This chapter details the technological advancements that enable the simulation of liver tissue dynamics, including nutrient exchange and waste accumulation, in a controlled *in-vitro* environment. **Chapter 5** further advances the modular model developed in Chapter 4 by incorporating vascular networks to better replicate the complex vascular structure of the liver. This enhancement is crucial for studying the diffusion of biomarkers and their role in disease progression and liver function. By integrating endothelial cells into the 3D liver model, this chapter aims to provide a more physiologically relevant system that can support extended studies of liver regeneration, disease progression, and the effects of therapeutic interventions.

Overall, this thesis presents a significant advancement in the fields of biomedical engineering and healthcare diagnostics by integrating electrochemical diagnostics with advanced 3D cell culture technologies. The development of these platforms addresses a critical need in the management of sepsis in liver diseases, particularly through the early detection and enhanced understanding of sepsis in cirrhotic patients. By providing rapid, sensitive, and multifunctional diagnostic and therapeutic capabilities, the platforms developed in this thesis hold the promise of transforming the landscape of liver disease diagnosis and treatment, paving the way for more effective clinical applications and improved patient outcomes. In conclusion, the work detailed in this thesis not only proposes innovative solutions to pressing healthcare challenges but also opens new avenues for the application of 3D cell culture technologies in studying complex

diseases. The integration of vascular components into 3D models represents a particularly novel approach that could significantly enhance the fidelity of *in-vitro* systems to *in-vivo* conditions, thereby improving the predictive accuracy of pre-clinical models in drug development and disease modeling. **Chapter 6** includes detailed conclusions and future outlook of the thesis.

## सार

यकृत रोग एक प्रमुख वैश्विक स्वास्थ्य चिंता है, जो दुनिया भर में मृत्यु दर में महत्वपूर्ण योगदान देता है। विश्व स्वास्थ्य संगठन के अनुसार, यकृत रोगों के कारण दुनिया भर में प्रति वर्ष लगभग 2 मिलियन मौतें होती हैं। यकृत रोगों से जुड़ी असंख्य जटिलताओं में, सिरोसिस और इसके परिणामस्वरूप जीवाणु सेप्सिस के प्रति संवेदनशीलता विशेष रूप से घातक है। सिरोसिस के रोगियों में जीवाणु सेप्सिस की मृत्यु दर गैर-सिरोसिस सेप्सिस वाले रोगियों की तुलना में पाँच गुना अधिक है। यकृत सिरोसिस के रोगियों में जीवाणु सेप्सिस की शुरुआत से उत्पन्न नैदानिक चुनौतियाँ पारंपरिक निदान विधियों की अपर्याप्तता के कारण गंभीर हैं। ये विधियाँ, जिनमें पॉलीमरेज़ चेन रिएक्शन (पीसीआर) और एंजाइम-लिंकड इम्यूनोसॉर्बेंट परख (एलिसा) जैसे संस्कृति-आधारित या आणविक परीक्षण शामिल हैं, अक्सर धीमी होती हैं और प्रभावी प्रारंभिक हस्तक्षेप के लिए आवश्यक तेज़ और सटीक निदान की तत्काल आवश्यकता को पूरा करने में विफल रहती हैं। इन चुनौतियों को पहचानते हुए, यह थीसिस विशेष रूप से यकृत रोगों के लिए डिज़ाइन किए गए 3D इन-विट्रो प्लेटफ़ॉर्म के विकास के माध्यम से अभिनव नैदानिक और चिकित्सीय प्रगति का परिचय देती है। अनुसंधान में इलेक्ट्रोकेमिकल तकनीकों के साथ उन्नत माइक्रोजेल प्रौद्योगिकियों का उपयोग किया गया है ताकि प्लाज्मा में प्रोटीन बायोमार्करों का तेजी से पता लगाने और सटीक मात्रा का ठहराव बढ़ाया जा सके, विशेष रूप से लिवर सिरोसिस के रोगियों के लिए। इस डॉक्टरेट कार्य में कई अध्याय शामिल हैं। प्रत्येक अध्याय में सच्चे पॉइंट-ऑफ-केयर सेप्सिस डायग्नोस्टिक्स को बेहतर बनाने और एक कदम और करीब ले जाने के विचार पर निर्माण होता है। यह कार्य उन्नत बायोइंजीनियरिंग दृष्टिकोणों के माध्यम से लिवर पैथोफिज़ियोलॉजी की समझ को भी बढ़ाता है। **अध्याय 1** विशेष रूप से लिवर सिरोसिस के मामलों में सेप्सिस का समय पर पता लगाने में मौजूदा तरीकों की महत्वपूर्ण सीमाओं की समीक्षा करके एक नए डायग्नोस्टिक प्लेटफ़ॉर्म के विकास के लिए मूलभूत ज्ञान और तात्कालिकता को निर्धारित करता है। यह ऐसे तीव्र डायग्नोस्टिक्स की आवश्यकता पर प्रकाश डालता है जो वर्तमान कल्चर-आधारित और आणविक डायग्नोस्टिक तकनीकों की सीमाओं को पार कर सके। **अध्याय 2** प्लेटफ़ॉर्म माइक्रोजेल को इलेक्ट्रोकेमिकल सेंसर के साथ एकीकृत करता है ताकि बैक्टीरिया की वृद्धि को गतिशील और सटीक रूप से पकड़ा और पहचाना जा सके। चक्रीय वोल्तामेट्री का उपयोग करके, यह सिस्टम माइक्रोजेल में सह-कैप्सुलेटेड कार्बन नैनो डॉट्स की मदद से रेडॉक्स परिवर्तनों को पढ़ता है। रेडॉक्स परिवर्तन प्लाज्मा के भीतर समय के साथ बैक्टीरिया की वृद्धि के कारण होते हैं। अनुकूलित प्लेटफ़ॉर्म निदान के लिए आवश्यक समय को दिनों से घटाकर मात्र कुछ घंटों में कर देता है। यह अध्याय लिवर सिरोसिस के रोगियों से नैदानिक नमूनों का उपयोग करके सत्यापन परिणाम प्रस्तुत करता है, जो वास्तविक दुनिया की सेटिंग्स में प्लेटफ़ॉर्म की प्रभावशीलता को प्रदर्शित करता है। **अध्याय 3** पिछले

अध्याय में विकसित इलेक्ट्रोकेमिकल सेंसिंग प्लेटफ़ॉर्म की कार्यक्षमता का विस्तार करता है, जिसमें एक मल्टीप्लेक्स दृष्टिकोण शामिल है जो मेजबान और रोगजनक दोनों बायोमार्कर का एक साथ पता लगाने में सक्षम है। यह अध्याय व्यापक नैदानिक प्रोफ़ाइल प्रदान करने के लिए लिपोपॉलीसेकेराइड (LPS) जैसे रोगजनक मार्करों के साथ-साथ प्रोकेल्सीटोनिन (PCT), इंटरल्यूकिन-6 (IL-6), और सी-रिएक्टिव प्रोटीन (CRP) जैसे मेजबान भड़काऊ मार्करों का पता लगाने के महत्व पर जोर देता है। यह उन्नत क्षमता अधिक सटीक और समय पर नैदानिक निर्णय लेने की अनुमति देती है, तथा प्लेटफ़ॉर्म की बढ़ी हुई संवेदनशीलता और विशिष्टता का लाभ उठाकर ELISA जैसी पारंपरिक नैदानिक विधियों को पार कर जाती है।

इसके अलावा, सेप्सिस से जुड़े मेजबान और रोगजनक प्रोटीन मार्करों की भूमिका की बेहतर समझ प्राप्त करने के लिए, मार्करों और रोग प्रगति के बीच सह-संबंध आवश्यक है। यह समझ सेल-इंटरैक्शन और सेल-कठोरता जैसी महत्वपूर्ण मेजबान जानकारी प्रदान करेगी। इसलिए, **अध्याय 4** एक गतिशील, मॉड्यूलर हेपेटोसाइट सह-संस्कृति प्लेटफ़ॉर्म विकसित करने पर ध्यान केंद्रित करता है जो यकृत की शारीरिक स्थितियों की अधिक सटीक नकल करता है। यह माइक्रोजेल-आधारित मॉड्यूलर सिस्टम सेल-सेल और सेल-मैट्रिक्स इंटरैक्शन पर सटीक नियंत्रण की अनुमति देने के लिए डिज़ाइन किया गया है, जो यकृत संक्रमण और यकृत स्वास्थ्य के लिए महत्वपूर्ण अंतर्निहित सेलुलर कार्यक्षमता का अध्ययन करने के लिए आवश्यक है। यह अध्याय तकनीकी प्रगति का विवरण देता है जो नियंत्रित इन-विट्रो वातावरण में पोषक तत्वों के आदान-प्रदान और अपशिष्ट संचय सहित यकृत ऊतक गतिशीलता के अनुकरण को सक्षम करता है। **अध्याय 5** यकृत की जटिल संवहनी संरचना को बेहतर ढंग से दोहराने के लिए संवहनी नेटवर्क को शामिल करके अध्याय 4 में विकसित मॉड्यूलर मॉडल को आगे बढ़ाता है। यह वृद्धि बायोमार्करों के प्रसार और रोग प्रगति और यकृत कार्य में उनकी भूमिका का अध्ययन करने के लिए महत्वपूर्ण है। 3D लिवर मॉडल में एंडोथेलियल कोशिकाओं को एकीकृत करके, इस अध्याय का उद्देश्य एक अधिक शारीरिक रूप से प्रासंगिक प्रणाली प्रदान करना है जो लिवर पुनर्जनन, रोग प्रगति और चिकित्सीय हस्तक्षेपों के प्रभावों के विस्तारित अध्ययनों का समर्थन कर सकती है। कुल मिलाकर, यह थीसिस उन्नत 3D सेल कल्चर तकनीकों के साथ इलेक्ट्रोकेमिकल डायग्नोस्टिक्स को एकीकृत करके बायोमेडिकल इंजीनियरिंग और हेल्थकेयर डायग्नोस्टिक्स के क्षेत्र में एक महत्वपूर्ण उन्नति प्रस्तुत करती है। इन प्लेटफ़ॉर्म का विकास लिवर रोगों में सेप्सिस के प्रबंधन में एक महत्वपूर्ण आवश्यकता को संबोधित करता है, विशेष रूप से सिरोसिस के रोगियों में सेप्सिस का शीघ्र पता लगाने और बेहतर समझ के माध्यम से। तेज़, संवेदनशील और बहुक्रियाशील नैदानिक और चिकित्सीय क्षमताएँ प्रदान करके, इस थीसिस में विकसित प्लेटफ़ॉर्म लिवर रोग निदान और उपचार के परिदृश्य को बदलने का वादा करते हैं, और अधिक प्रभावी नैदानिक अनुप्रयोगों और बेहतर रोगी परिणामों का मार्ग प्रशस्त करते हैं। निष्कर्ष में, इस थीसिस

में विस्तृत कार्य न केवल स्वास्थ्य देखभाल चुनौतियों को दबाने के लिए अभिनव समाधान प्रस्तावित करता है, बल्कि जटिल रोगों के अध्ययन में 3D सेल कल्चर तकनीकों के अनुप्रयोग के लिए नए रास्ते भी खोलता है। 3डी मॉडल में संवहनी घटकों का एकीकरण एक विशेष रूप से नवीन दृष्टिकोण का प्रतिनिधित्व करता है जो इन-विट्रो प्रणालियों की इन-विवो स्थितियों के प्रति निष्ठा को महत्वपूर्ण रूप से बढ़ा सकता है, जिससे दवा विकास और रोग मॉडलिंग में प्री-क्लीनिकल मॉडल की पूर्वानुमान सटीकता में सुधार हो सकता है। **अध्याय 6** में थीसिस के विस्तृत निष्कर्ष और भविष्य के दृष्टिकोण शामिल हैं।

## ਸੰਖੇਪ

ਜਿਗਰ ਦੀਆਂ ਬਿਮਾਰੀਆਂ ਇੱਕ ਪ੍ਰਮੁੱਖ ਵਿਸ਼ਵਵਿਆਪੀ ਸਿਹਤ ਚਿੰਤਾ ਹਨ, ਜੋ ਦੁਨੀਆ ਭਰ ਵਿੱਚ ਮੌਤ ਦਰ ਵਿੱਚ ਮਹੱਤਵਪੂਰਨ ਯੋਗਦਾਨ ਪਾਉਂਦੀਆਂ ਹਨ। ਵਿਸ਼ਵ ਸਿਹਤ ਸੰਗਠਨ ਦੇ ਅਨੁਸਾਰ, ਜਿਗਰ ਦੀਆਂ ਬਿਮਾਰੀਆਂ ਦੇ ਨਤੀਜੇ ਵਜੋਂ ਵਿਸ਼ਵ ਪੱਧਰ 'ਤੇ ਪ੍ਰਤੀ ਸਾਲ ਲਗਭਗ 20 ਲੱਖ ਮੌਤਾਂ ਹੁੰਦੀਆਂ ਹਨ। ਜਿਗਰ ਦੀਆਂ ਬਿਮਾਰੀਆਂ ਨਾਲ ਜੁੜੀਆਂ ਅਣਗਿਣਤ ਪੇਚੀਦਗੀਆਂ ਵਿੱਚੋਂ, ਸਿਰੋਸਿਸ ਅਤੇ ਬੈਕਟੀਰੀਆ ਦੇ ਸੈਪਸਿਸ ਪ੍ਰਤੀ ਇਸਦੀ ਸੰਵੇਦਨਸ਼ੀਲਤਾ ਖਾਸ ਤੌਰ 'ਤੇ ਘਾਤਕ ਹੈ। ਸਿਰੋਸਿਸ ਦੇ ਮਰੀਜ਼ਾਂ ਵਿੱਚ ਬੈਕਟੀਰੀਆ ਦੇ ਸੈਪਸਿਸ ਦੀ ਮੌਤ ਦਰ ਸੇਪਸਿਸ ਵਾਲੇ ਗੈਰ-ਸਿਰੋਟਿਕ ਮਰੀਜ਼ਾਂ ਨਾਲੋਂ ਪੰਜ ਗੁਣਾ ਵੱਧ ਹੈ। ਜਿਗਰ ਦੇ ਸਿਰੋਸਿਸ ਦੇ ਮਰੀਜ਼ਾਂ ਵਿੱਚ ਬੈਕਟੀਰੀਆ ਦੇ ਸੈਪਸਿਸ ਦੀ ਸ਼ੁਰੂਆਤ ਦੁਆਰਾ ਪੈਦਾ ਹੋਣ ਵਾਲੀਆਂ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕ ਚੁਣੌਤੀਆਂ ਰਵਾਇਤੀ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕ ਤਰੀਕਿਆਂ ਦੀ ਘਾਟ ਕਾਰਨ ਗੰਭੀਰ ਹਨ। ਇਹ ਵਿਧੀਆਂ, ਜਿਨ੍ਹਾਂ ਵਿੱਚ ਪੌਲੀਮੇਰੇਜ਼ ਚੇਨ ਰਿਐਕਸ਼ਨ (ਪੀਸੀਆਰ) ਅਤੇ ਐਨਜ਼ਾਈਮ-ਲਿੰਕਡ ਇਮਯੂਨੋਸੋਰਬੈਂਟ ਅਸੇ (ELISA) ਵਰਗੇ ਕਲਚਰ-ਅਧਾਰਤ ਜਾਂ ਅਣੂ ਟੈਸਟ ਸ਼ਾਮਲ ਹਨ, ਅਕਸਰ ਹੌਲੀ ਹੁੰਦੀਆਂ ਹਨ ਅਤੇ ਪ੍ਰਭਾਵਸ਼ਾਲੀ ਸ਼ੁਰੂਆਤੀ ਦਖਲਅੰਦਾਜ਼ੀ ਲਈ ਜ਼ਰੂਰੀ ਤੇਜ਼ ਅਤੇ ਸਹੀ ਨਿਦਾਨ ਦੀ ਤੁਰੰਤ ਲੋੜ ਨੂੰ ਪੂਰਾ ਕਰਨ ਵਿੱਚ ਅਸਫਲ ਰਹਿੰਦੀਆਂ ਹਨ। ਇਹਨਾਂ ਚੁਣੌਤੀਆਂ ਨੂੰ ਪਛਾਣਦੇ ਹੋਏ, ਇਹ ਥੀਸਿਸ ਜਿਗਰ ਦੀਆਂ ਬਿਮਾਰੀਆਂ ਲਈ ਵਿਸ਼ੇਸ਼ ਤੌਰ 'ਤੇ ਤਿਆਰ ਕੀਤੇ ਗਏ 3D ਇਨ-ਵਿਟਰੋ ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਦੇ ਵਿਕਾਸ ਦੁਆਰਾ ਨਵੀਨਤਾਕਾਰੀ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕ ਅਤੇ ਇਲਾਜ ਸੰਬੰਧੀ ਤਰੱਕੀਆਂ ਪੇਸ਼ ਕਰਦਾ ਹੈ। ਇਹ ਖੋਜ ਪਲਾਜ਼ਮਾ ਵਿੱਚ ਪ੍ਰੋਟੀਨ ਬਾਇਓਮਾਰਕਰਾਂ ਦੀ ਤੇਜ਼ ਖੋਜ ਅਤੇ ਸਟੀਕ ਮਾਤਰਾ ਨੂੰ ਵਧਾਉਣ ਲਈ, ਖਾਸ ਕਰਕੇ ਜਿਗਰ ਦੇ ਸਿਰੋਸਿਸ ਮਰੀਜ਼ਾਂ ਲਈ, ਇਲੈਕਟ੍ਰੋਕੈਮੀਕਲ ਤਕਨੀਕਾਂ ਦੇ ਨਾਲ ਮਿਲ ਕੇ ਉੱਨਤ ਮਾਈਕ੍ਰੋਜੇਲ ਤਕਨਾਲੋਜੀਆਂ ਦੀ ਵਰਤੋਂ ਕਰਦੀ ਹੈ। ਇਹ ਡਾਕਟਰੇਟ ਕੰਮ ਕਈ ਅਧਿਆਵਾਂ ਨੂੰ ਕਵਰ ਕਰਦਾ ਹੈ। ਹਰੇਕ ਅਧਿਆਇ ਸਹੀ ਪੁਆਇੰਟ-ਆਫ-ਕੇਅਰ ਸੈਪਸਿਸ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕਸ ਨੂੰ ਬਿਹਤਰ ਬਣਾਉਣ ਅਤੇ ਇੱਕ ਕਦਮ ਅੱਗੇ ਵਧਾਉਣ ਦੇ ਵਿਚਾਰ 'ਤੇ ਨਿਰਮਾਣ ਕਰਦਾ ਹੈ। ਇਹ ਕੰਮ ਉੱਨਤ ਬਾਇਓਇੰਜੀਨੀਅਰਿੰਗ ਪਹੁੰਚਾਂ ਰਾਹੀਂ ਜਿਗਰ ਦੇ ਪੈਥੋਫਿਜ਼ੀਓਲੋਜੀ ਦੀ ਸਮਝ ਨੂੰ ਵੀ ਵਧਾਉਂਦਾ ਹੈ।

**ਅਧਿਆਇ 1** ਸੇਪਸਿਸ ਦੀ ਸਮੇਂ ਸਿਰ ਖੋਜ ਵਿੱਚ ਮੌਜੂਦਾ ਤਰੀਕਿਆਂ ਦੀਆਂ ਮਹੱਤਵਪੂਰਨ ਸੀਮਾਵਾਂ ਦੀ ਸਮੀਖਿਆ ਕਰਕੇ ਇੱਕ ਨਵੇਂ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕ ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਦੇ ਵਿਕਾਸ ਲਈ ਬੁਨਿਆਦੀ ਗਿਆਨ ਅਤੇ ਜ਼ਰੂਰੀਤਾ ਨਿਰਧਾਰਤ ਕਰਦਾ ਹੈ, ਖਾਸ ਕਰਕੇ ਜਿਗਰ ਦੇ ਸਿਰੋਸਿਸ ਦੇ ਮਾਮਲਿਆਂ ਵਿੱਚ। ਇਹ ਤੇਜ਼ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕਸ ਦੀ ਜ਼ਰੂਰਤ ਨੂੰ ਉਜਾਗਰ ਕਰਦਾ ਹੈ ਜੋ ਮੌਜੂਦਾ ਸੱਭਿਆਚਾਰ-ਅਧਾਰਤ ਅਤੇ ਅਣੂ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕ ਤਕਨੀਕਾਂ ਦੀਆਂ ਸੀਮਾਵਾਂ ਨੂੰ ਪਾਰ ਕਰ ਸਕਦਾ ਹੈ, ਜੋ ਅਕਸਰ ਸਮੇਂ ਸਿਰ ਇਲਾਜ ਸੰਬੰਧੀ ਦਖਲਅੰਦਾਜ਼ੀ ਦੀ ਸਹੂਲਤ ਲਈ ਬਹੁਤ ਹੌਲੀ ਹੁੰਦੀਆਂ ਹਨ।

**ਅਧਿਆਇ 2** ਜਿਗਰ ਦੇ ਸਿਰੋਸਿਸ ਮਰੀਜ਼ਾਂ ਵਿੱਚ ਬੈਕਟੀਰੀਆ ਦੇ ਸੈਪਸਿਸ ਦੀ ਖੋਜ ਲਈ ਵਿਸ਼ੇਸ਼ ਤੌਰ 'ਤੇ ਤਿਆਰ ਕੀਤੇ ਗਏ ਇੱਕ ਗੈਰ-ਹਮਲਾਵਰ, ਤੇਜ਼ ਇਲੈਕਟ੍ਰੋਕੈਮੀਕਲ ਸੈਂਸਿੰਗ ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਦੇ ਵਿਕਾਸ ਬਾਰੇ ਚਰਚਾ ਕਰਦਾ ਹੈ। ਇਹ ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਮਾਈਕ੍ਰੋਜੇਲ ਨੂੰ ਗਤੀਸ਼ੀਲ ਅਤੇ ਸਹੀ ਢੰਗ ਨਾਲ ਬੈਕਟੀਰੀਆ ਦੇ ਵਾਧੇ ਨੂੰ ਹਾਸਲ ਕਰਨ ਅਤੇ ਖੋਜਣ ਲਈ ਇਲੈਕਟ੍ਰੋਕੈਮੀਕਲ ਸੈਂਸਰਾਂ ਨਾਲ ਜੋੜਦਾ ਹੈ। ਸਾਈਕਲਿਕ ਵੋਲਟੈਮੈਟਰੀ ਦੀ ਵਰਤੋਂ ਕਰਕੇ, ਇਹ ਸਿਸਟਮ ਮਾਈਕ੍ਰੋਜੇਲਾਂ ਵਿੱਚ ਸਹਿ-ਇਨਕੈਪਸੂਲੇਟ ਕੀਤੇ ਕਾਰਬਨ ਨੈਨ ਡੋਟਸ ਦੀ ਮਦਦ ਨਾਲ ਰੈਡੌਕਸ ਤਬਦੀਲੀਆਂ ਨੂੰ ਪੜ੍ਹਦਾ

ਹੈ। ਰੈਡੋਕਸ ਤਬਦੀਲੀਆਂ ਪਲਾਜ਼ਮਾ ਦੇ ਅੰਦਰ ਸਮੇਂ ਦੇ ਨਾਲ ਬੈਕਟੀਰੀਆ ਦੇ ਵਾਧੇ ਕਾਰਨ ਹੁੰਦੀਆਂ ਹਨ। ਅਨੁਕੂਲਿਤ ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਨਿਦਾਨ ਲਈ ਲੋੜੀਂਦੇ ਸਮੇਂ ਨੂੰ ਦਿਨਾਂ ਤੋਂ ਸਿਰਫ਼ ਘੰਟਿਆਂ ਤੱਕ ਘਟਾ ਦਿੰਦਾ ਹੈ। ਅਧਿਆਇ ਜਿਗਰ ਦੇ ਸਿਰੋਟਿਕ ਮਾਰਕਰਾਂ ਤੋਂ ਕਲੀਨਿਕਲ ਨਮੂਨਿਆਂ ਦੀ ਵਰਤੋਂ ਕਰਕੇ ਪ੍ਰਮਾਣਿਕਤਾ ਦੇ ਨਤੀਜੇ ਪੇਸ਼ ਕਰਦਾ ਹੈ, ਜੋ ਅਸਲ-ਸੰਸਾਰ ਸੈਟਿੰਗਾਂ ਵਿੱਚ ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਦੀ ਪ੍ਰਭਾਵਸ਼ੀਲਤਾ ਨੂੰ ਦਰਸਾਉਂਦਾ ਹੈ। **ਅਧਿਆਇ 3** ਪਿਛਲੇ ਅਧਿਆਇ ਵਿੱਚ ਵਿਕਸਤ ਕੀਤੇ ਗਏ ਇਲੈਕਟ੍ਰੋਕੈਮੀਕਲ ਸੈਂਸਿੰਗ ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਦੀ ਕਾਰਜਸ਼ੀਲਤਾ ਨੂੰ ਵਧਾਉਂਦਾ ਹੈ ਜੋ ਇੱਕੋ ਸਮੇਂ ਹੋਸਟ ਅਤੇ ਪੈਥੋਜਨ ਬਾਇਓਮਾਰਕਰ ਦੋਵਾਂ ਦਾ ਪਤਾ ਲਗਾਉਣ ਦੇ ਸਮਰੱਥ ਮਲਟੀਪਲੈਕਸਡ ਪਹੁੰਚ ਨੂੰ ਸ਼ਾਮਲ ਕਰਦਾ ਹੈ। ਇਹ ਅਧਿਆਇ ਪ੍ਰੋਕੈਲਸੀਟੋਨਿਨ (PCT), ਇੰਟਰਲਿਊਕਿਨ-6 (IL-6), ਅਤੇ C-ਰਿਐਕਟਿਵ ਪ੍ਰੋਟੀਨ (CRP) ਵਰਗੇ ਹੋਸਟ ਇਨਫਲਾਮੇਟਰੀ ਮਾਰਕਰਾਂ ਦਾ ਪਤਾ ਲਗਾਉਣ ਦੀ ਮਹੱਤਤਾ 'ਤੇ ਜ਼ੋਰ ਦਿੰਦਾ ਹੈ, ਲਿਪੋਪੋਲੀਸੈਕਰਾਈਡ (LPS) ਵਰਗੇ ਪੈਥੋਜਨ ਮਾਰਕਰਾਂ ਦੇ ਨਾਲ, ਇੱਕ ਵਿਆਪਕ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕ ਪ੍ਰੋਫਾਈਲ ਪ੍ਰਦਾਨ ਕਰਨ ਲਈ। ਇਹ ਵਧੀ ਹੋਈ ਸਮਰੱਥਾ ਵਧੇਰੇ ਸਹੀ ਅਤੇ ਸਮੇਂ ਸਿਰ ਕਲੀਨਿਕਲ ਫੈਸਲੇ ਲੈਣ ਦੀ ਆਗਿਆ ਦਿੰਦੀ ਹੈ, ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਦੀ ਵਧੀ ਹੋਈ ਸੰਵੇਦਨਸ਼ੀਲਤਾ ਅਤੇ ਵਿਸ਼ੇਸ਼ਤਾ ਨੂੰ ELISA ਵਰਗੇ ਰਵਾਇਤੀ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕ ਤਰੀਕਿਆਂ ਨੂੰ ਪਛਾੜਨ ਲਈ ਵਰਤਦੀ ਹੈ।

ਇਸ ਤੋਂ ਇਲਾਵਾ, ਸੈਪਸਿਸ ਨਾਲ ਜੁੜੇ ਹੋਸਟ ਅਤੇ ਪੈਥੋਜਨ ਪ੍ਰੋਟੀਨ ਮਾਰਕਰਾਂ ਦੀ ਭੂਮਿਕਾ ਦੀ ਬਿਹਤਰ ਸਮਝ ਪ੍ਰਾਪਤ ਕਰਨ ਲਈ, ਮਾਰਕਰਾਂ ਅਤੇ ਬਿਮਾਰੀ ਦੇ ਵਿਕਾਸ ਵਿਚਕਾਰ ਸਹਿ-ਸਬੰਧ ਜ਼ਰੂਰੀ ਹੈ। ਇਹ ਸਮਝ ਸੈੱਲ-ਇੰਟਰੈਕਸ਼ਨਾਂ ਅਤੇ ਸੈੱਲ-ਸਟੀਫਨੈਂਸ ਵਰਗੀ ਮਹੱਤਵਪੂਰਨ ਹੋਸਟ ਜਾਣਕਾਰੀ ਪ੍ਰਦਾਨ ਕਰੇਗੀ। ਇਸ ਲਈ, **ਅਧਿਆਇ 4** ਇੱਕ ਗਤੀਸ਼ੀਲ, ਮਾਡਿਊਲਰ ਹੈਪੇਟੋਸਾਈਟ ਸਹਿ-ਸੱਭਿਆਚਾਰ ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਵਿਕਸਤ ਕਰਨ 'ਤੇ ਕੇਂਦਰ ਕਰਦਾ ਹੈ ਜੋ ਜਿਗਰ ਦੀਆਂ ਸਰੀਰਕ ਸਥਿਤੀਆਂ ਦੀ ਵਧੇਰੇ ਸਹੀ ਨਕਲ ਕਰਦਾ ਹੈ। ਇਹ ਮਾਈਕ੍ਰੋਜੈੱਲ-ਅਧਾਰਤ ਮਾਡਿਊਲਰ ਸਿਸਟਮ ਸੈੱਲ-ਸੈੱਲ ਅਤੇ ਸੈੱਲ-ਮੈਟ੍ਰਿਕਸ ਪਰਸਪਰ ਪ੍ਰਭਾਵ 'ਤੇ ਸਹੀ ਨਿਯੰਤਰਣ ਦੀ ਆਗਿਆ ਦੇਣ ਲਈ ਤਿਆਰ ਕੀਤਾ ਗਿਆ ਹੈ, ਜੋ ਕਿ ਜਿਗਰ ਦੀ ਲਾਗ ਅਤੇ ਜਿਗਰ ਦੀ ਸਿਹਤ ਲਈ ਮਹੱਤਵਪੂਰਨ ਅੰਦਰੂਨੀ ਸੈਲੂਲਰ ਕਾਰਜਸ਼ੀਲਤਾ ਦਾ ਅਧਿਐਨ ਕਰਨ ਲਈ ਜ਼ਰੂਰੀ ਹੈ। ਇਹ ਅਧਿਆਇ ਤਕਨੀਕੀ ਤਰੱਕੀ ਦਾ ਵੇਰਵਾ ਦਿੰਦਾ ਹੈ ਜੋ ਇੱਕ ਨਿਯੰਤਰਿਤ ਇਨ-ਵਿਟਰੋ ਵਾਤਾਵਰਣ ਵਿੱਚ ਪੌਸ਼ਟਿਕ ਤੱਤਾਂ ਦੇ ਆਦਾਨ-ਪ੍ਰਦਾਨ ਅਤੇ ਰਹਿੰਦ-ਖੂੰਹਦ ਇਕੱਠਾ ਕਰਨ ਸਮੇਤ ਜਿਗਰ ਦੇ ਟਿਸ਼ੂ ਗਤੀਸ਼ੀਲਤਾ ਦੇ ਸਿਮੂਲੇਸ਼ਨ ਨੂੰ ਸਮਰੱਥ ਬਣਾਉਂਦਾ ਹੈ। **ਅਧਿਆਇ 5** ਜਿਗਰ ਦੀ ਗੁੰਝਲਦਾਰ ਨਾੜੀ ਬਣਤਰ ਨੂੰ ਬਿਹਤਰ ਢੰਗ ਨਾਲ ਦੁਹਰਾਉਣ ਲਈ ਨਾੜੀ ਨੈਟਵਰਕਾਂ ਨੂੰ ਸ਼ਾਮਲ ਕਰਕੇ ਅਧਿਆਇ 4 ਵਿੱਚ ਵਿਕਸਤ ਮਾਡਿਊਲਰ ਮਾਡਲ ਨੂੰ ਅੱਗੇ ਵਧਾਉਂਦਾ ਹੈ। ਇਹ ਵਾਧਾ ਬਾਇਓਮਾਰਕਰਾਂ ਦੇ ਪ੍ਰਸਾਰ ਅਤੇ ਬਿਮਾਰੀ ਦੇ ਵਿਕਾਸ ਅਤੇ ਜਿਗਰ ਦੇ ਕਾਰਜ ਵਿੱਚ ਉਨ੍ਹਾਂ ਦੀ ਭੂਮਿਕਾ ਦਾ ਅਧਿਐਨ ਕਰਨ ਲਈ ਮਹੱਤਵਪੂਰਨ ਹੈ। ਐਂਡੋਥੈਲੀਅਲ ਸੈੱਲਾਂ ਨੂੰ 3D ਜਿਗਰ ਮਾਡਲ ਵਿੱਚ ਜੋੜ ਕੇ, ਇਸ ਅਧਿਆਇ ਦਾ ਉਦੇਸ਼ ਇੱਕ ਹੋਰ ਸਰੀਰਕ ਤੌਰ 'ਤੇ ਸੰਬੰਧਿਤ ਪ੍ਰਣਾਲੀ ਪ੍ਰਦਾਨ ਕਰਨਾ ਹੈ ਜੋ ਜਿਗਰ ਦੇ ਪੁਨਰਜਨਮ, ਬਿਮਾਰੀ ਦੀ ਪ੍ਰਗਤੀ, ਅਤੇ ਇਲਾਜ ਸੰਬੰਧੀ ਦਖਲਅੰਦਾਜ਼ੀ ਦੇ ਪ੍ਰਭਾਵਾਂ ਦੇ ਵਿਸਤ੍ਰਿਤ ਅਧਿਐਨਾਂ ਦਾ ਸਮਰਥਨ ਕਰ ਸਕਦਾ ਹੈ।

ਕੁੱਲ ਮਿਲਾ ਕੇ, ਇਹ ਥੀਸਿਸ ਬਾਇਓਮੈਡੀਕਲ ਇੰਜੀਨੀਅਰਿੰਗ ਅਤੇ ਸਿਹਤ ਸੰਭਾਲ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕਸ ਦੇ ਖੇਤਰਾਂ

ਵਿੱਚ ਇਲੈਕਟ੍ਰੋਕੈਮੀਕਲ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕਸ ਨੂੰ ਉੱਨਤ 3D ਸੈੱਲ ਕਲਚਰ ਤਕਨਾਲੋਜੀਆਂ ਨਾਲ ਜੋੜ ਕੇ ਇੱਕ ਮਹੱਤਵਪੂਰਨ ਤਰੱਕੀ ਪੇਸ਼ ਕਰਦਾ ਹੈ। ਇਹਨਾਂ ਪਲੇਟਫਾਰਮਾਂ ਦਾ ਵਿਕਾਸ ਜਿਗਰ ਦੀਆਂ ਬਿਮਾਰੀਆਂ ਵਿੱਚ ਸੈਪਸਿਸ ਦੇ ਪ੍ਰਬੰਧਨ ਵਿੱਚ ਇੱਕ ਮਹੱਤਵਪੂਰਨ ਜ਼ਰੂਰਤ ਨੂੰ ਪੂਰਾ ਕਰਦਾ ਹੈ, ਖਾਸ ਤੌਰ 'ਤੇ ਸਿਰੋਟਿਕ ਮਰੀਜ਼ਾਂ ਵਿੱਚ ਸੈਪਸਿਸ ਦੀ ਸ਼ੁਰੂਆਤੀ ਖੋਜ ਅਤੇ ਵਧੀ ਹੋਈ ਸਮਝ ਦੁਆਰਾ। ਤੇਜ਼, ਸੰਵੇਦਨਸ਼ੀਲ, ਅਤੇ ਬਹੁ-ਕਾਰਜਸ਼ੀਲ ਡਾਇਗਨੋਸਟਿਕ ਅਤੇ ਇਲਾਜ ਸਮਰੱਥਾਵਾਂ ਪ੍ਰਦਾਨ ਕਰਕੇ, ਇਸ ਥੀਸਿਸ ਵਿੱਚ ਵਿਕਸਤ ਕੀਤੇ ਪਲੇਟਫਾਰਮ ਜਿਗਰ ਦੀ ਬਿਮਾਰੀ ਦੇ ਨਿਦਾਨ ਅਤੇ ਇਲਾਜ ਦੇ ਲੈਂਡਸਕੇਪ ਨੂੰ ਬਦਲਣ ਦਾ ਵਾਅਦਾ ਰੱਖਦੇ ਹਨ, ਵਧੇਰੇ ਪ੍ਰਭਾਵਸ਼ਾਲੀ ਕਲੀਨਿਕਲ ਐਪਲੀਕੇਸ਼ਨਾਂ ਅਤੇ ਬਿਹਤਰ ਮਰੀਜ਼ਾਂ ਦੇ ਨਤੀਜਿਆਂ ਲਈ ਰਾਹ ਪੱਧਰਾ ਕਰਦੇ ਹਨ। ਸਿੱਟੇ ਵਜੋਂ, ਇਸ ਥੀਸਿਸ ਵਿੱਚ ਵਿਸਤ੍ਰਿਤ ਕੰਮ ਨਾ ਸਿਰਫ਼ ਦਬਾਅ ਪਾਉਣ ਵਾਲੀਆਂ ਸਿਹਤ ਸੰਭਾਲ ਚੁਣੌਤੀਆਂ ਲਈ ਨਵੀਨਤਾਕਾਰੀ ਹੱਲ ਪੇਸ਼ ਕਰਦਾ ਹੈ ਬਲਕਿ ਗੁੰਝਲਦਾਰ ਬਿਮਾਰੀਆਂ ਦਾ ਅਧਿਐਨ ਕਰਨ ਵਿੱਚ 3D ਸੈੱਲ ਕਲਚਰ ਤਕਨਾਲੋਜੀਆਂ ਦੀ ਵਰਤੋਂ ਲਈ ਨਵੇਂ ਰਸਤੇ ਵੀ ਖੋਲ੍ਹਦਾ ਹੈ। 3D ਮਾਡਲਾਂ ਵਿੱਚ ਨਾੜੀ ਦੇ ਹਿੱਸਿਆਂ ਦਾ ਏਕੀਕਰਨ ਇੱਕ ਖਾਸ ਤੌਰ 'ਤੇ ਨਵਾਂ ਦ੍ਰਿਸ਼ਟੀਕੋਣ ਦਰਸਾਉਂਦਾ ਹੈ ਜੋ ਇਨ-ਵਿਟਰੋ ਪ੍ਰਣਾਲੀਆਂ ਦੀ ਇਨ-ਵਿਵੋ ਸਥਿਤੀਆਂ ਵਿੱਚ ਵਫ਼ਾਦਾਰੀ ਨੂੰ ਮਹੱਤਵਪੂਰਨ ਤੌਰ 'ਤੇ ਵਧਾ ਸਕਦਾ ਹੈ, ਇਸ ਤਰ੍ਹਾਂ ਡਰੱਗ ਵਿਕਾਸ ਅਤੇ ਬਿਮਾਰੀ ਮਾਡਲਿੰਗ ਵਿੱਚ ਪ੍ਰੀ-ਕਲੀਨਿਕਲ ਮਾਡਲਾਂ ਦੀ ਭਵਿੱਖਬਾਣੀ ਸ਼ੁੱਧਤਾ ਵਿੱਚ ਸੁਧਾਰ ਹੁੰਦਾ ਹੈ। **ਅਧਿਆਇ 6** ਵਿੱਚ ਥੀਸਿਸ ਦੇ ਵਿਸਤ੍ਰਿਤ ਸਿੱਟੇ ਅਤੇ ਭਵਿੱਖ ਦੇ ਦ੍ਰਿਸ਼ਟੀਕੋਣ ਸ਼ਾਮਲ ਹਨ।

## Table of Contents

Certificate	i
Acknowledgments	iii
Abstract	vii
List of Figures	xxv
List of Tables	xxxix
List of Schemes	xxxix
List of Abbreviations	xxxv

### Chapter 1 Introduction to 3D *in-vitro* electrochemical diagnostics

1.1. Introduction.....	3
1.2. Pathophysiology of Liver Cirrhosis and its association with sepsis.....	5
1.3. Biomarkers and their Challenges	
1.3.1. Biomarkers studied for sepsis detection in cirrhotic patients .....	7
1.3.2. Challenges in detecting biomarkers associated with sepsis and sepsis in liver cirrhotic patients .....	11
1.4. Electrochemical detection of sepsis associated pathogen and host protein marker.....	12
1.4.1. Overview of Electrochemical Sensors .....	12
1.4.2. Electrochemical sensing platforms for sepsis associated host protein marker detection .....	14
1.4.3. Electrochemical sensing platforms for sepsis associated pathogen protein marker detection.....	17
1.5. Challenges with existing protein marker detection methods .....	20
1.5.1. Biomarker Variability and Sensitivity Issues .....	20
1.5.2. Technical and Operational Challenges .....	21
1.5.3. Regulatory and Standardization Issues .....	22
1.5.4. Integration of Host-Pathogen Interaction Detection .....	22
1.6. 3D liver models and liver disease diagnostics .....	23
1.6.1. Overview of 3D <i>in-vitro</i> Liver models for disease modeling .....	23

1.6.1.1 Non-scaffold approach .....	23
1.6.1.2 Scaffold approach .....	25
1.6.2. Liver Vascularized Models .....	27
1.6.3. Current methods for liver disease diagnostics .....	27
1.6.4. 3D electrochemical platform for liver disease diagnostics .....	28
1.7. Conclusion and outlook .....	29
1.8. Objectives of the Study .....	30
1.9. Outline of the Thesis .....	31
References .....	32
<b>Chapter 2: Developing rapid electrochemical platform for bacterial sepsis detection</b>	
2.1. Introduction.....	51
2.2. Materials and Methods.....	56
2.2.1. Synthesis of carbon dots and their characterization .....	56
2.2.2. Encapsulation of biological samples and CDs in alginate-based micro scaffolds .....	56
2.2.3. Encapsulation and electrochemical cell growth determination of bacteria spiked in healthy plasma .....	57
2.2.4. Electrochemical studies of clinical samples.....	57
2.2.5. Validation of the clinical samples by other bacteria staining methods .....	58
2.2.6. Electrochemical studies for bacterial classification .....	58
2.2.7. Antibiotic susceptibility assay .....	58
2.2.8. Statistical Analysis .....	59
2.3. Results & Discussion.....	59
2.3.1. Carbon Dots characterization .....	59
2.3.2. Electrochemical studies of biological samples in microscaffolds .....	60
2.3.3. Electrochemical studies and Validation of clinical samples .....	64
2.3.4. Analysis of Culture-negative but ECS-positive patients .....	67
2.3.5. Diagnostic Efficiency of ECS platform for detection of Confirmed Sepsis ...	71
2.3.6. Diagnostic Efficiency of ECS platform for detection of Confirmed and Suspected Sepsis .....	72
2.3.7. Bacterial class classification & Antibiotic susceptibility analysis.....	73

2.4. Discussion and Conclusion.....	76
References.....	79

**Chapter 3: Development of the electrochemical immunosensor platform for dual detection of sepsis associated pathogen and host protein markers**

3.1 Introduction.....	85
3.2 Materials and methods .....	90
3.2.1. Materials Required.....	90
3.2.2. Methodology .....	90
3.2.2.1. Preparation of Microgels.....	90
3.2.2.2. Preparation of label-free biofunctionalized SPE (bSPE) for host biomarker detection.....	91
3.2.2.3. Electrochemical immunosensor for host biomarker detection .....	92
3.2.2.4. Preparation of label-free electrochemical dual-detection immunosensor .....	92
3.3. Results and Discussions.....	93
3.3.1. Fabrication and Characterization of Immunosensors.....	93
3.3.2. Analytical Performance for Sensitivity and Specificity of the Immunosensors .....	98
3.3.3. Electrochemical analysis of the dual responsive immunosensor.....	105
3.4. Conclusion .....	108
References.....	110

**Chapter 4: Development of a microgel-based modular 3D *in-vitro* cell culture platform**

4.1. Introduction.....	117
4.2. Materials and methods .....	120
4.2.1. Materials .....	120
4.2.2. Preparation and optimization of microgels for cell encapsulation .....	121
4.2.3. Design determination of microfluidics chamber for <i>in-vitro</i> experiments .....	121
4.2.4. Synthesis of carbon dots and their characterization .....	122
4.2.5. Culturing and evaluating functionality cell-encapsulated microgel combinations within the dynamic environment .....	122

4.2.6. Evaluation of the cell functionality in microgels.....	122
4.2.7. Evaluation of CYP34A Gene expression in microgels .....	123
4.2.8. Immunofluorescence staining for Albumin production.....	124
4.2.9. Drug Toxicity Assay .....	124
4.2.10. Diffusion Assay .....	124
4.2.11. Cytoskeleton staining cell-matrix interactions.....	124
4.3. Results and Discussions.....	125
4.3.1. Fabricating Alginate-Gelatin Microgels for Cell Encapsulation.....	125
4.3.2. Comparing pH-sensitive Carbon dots with Alamar assay for cell proliferation .....	127
4.3.3. Functionality within Huh-7 encapsulated microgel combinations.....	132
4.3.4. Culturing cell-encapsulated microgel combinations within the Microfluidic Culture Platform .....	135
4.3.5. Diffusion and cell-cell interactions in dynamic conditions and drug toxicity evaluation .....	141
4.4. Conclusion .....	143
References.....	145
<b>Chapter 5: Development of a vascularized 3D in-vitro liver model to study bacterial infection.</b>	
5.1. Introduction.....	151
5.2. Materials and methods .....	154
5.2.1. Materials .....	154
5.2.2. Optimization of core-shell microgels for vascularized liver model .....	155
5.2.3. Preparation of core-shell microgels for vascularized liver model that mimics regenerative responses .....	156
5.2.4. Preparation of bacterial infected 3D liver vascularized model with regenerative responses.....	156
5.2.5. Quantification of bacterial infection biomarker detection.....	156
5.2.6. Albumin assay .....	157
5.2.7. Preparation of label-free biofunctionalized SPE (bSPE) for sepsis biomarker detection.....	157
5.2.8. Quantification of bacterial infection biomarker .....	158

5.3. Results and Discussions.....	158
5.3.1. Optimization of 3D <i>in-vitro</i> vascularized liver model .....	158
5.3.2. Development of 3D <i>in-vitro</i> vascularized liver model that mimics regenerative responses.....	162
5.3.3. Development of bacterial infected 3D liver regenerative vascularized model .....	165
5.3.4. Quantification of bacterial infection biomarker .....	167
5.4. Conclusion .....	169
References.....	171
<b>Chapter 6: Conclusion &amp; Outlook .....</b>	<b>175-178</b>
<b>Publication.....</b>	<b>181</b>
<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>183-186</b>

## List of Figures

Figure Number	Title	Page No.
<b>Chapter 1</b>		
Figure 1.1.	The different stages of cirrhosis: Classification proposed to subdivide the clinical course of liver cirrhosis considering histological, clinical, hemodynamic, and biological parameters	6
Figure 1.2.	The gut-origin sepsis hypothesis	7
Figure 1.3.	Various electrochemical techniques utilized for detection of host-pathogen protein markers associated with sepsis	14
<b>Chapter 2</b>		
Figure 2.1	Carbon dots characterization: a) TEM and b) Zeta-potential and c) Voltammograms of CDs after 15 mins of incubation	60
Figure 2.2	Electrochemical analysis of bacteria spiked plasma: (a) Current change over time of various biological samples (blood, plasma, proteins and only CDs) at different pH (5.5 and 7.4). (b) Cyclic Voltammogram to monitor the bacterial growth in the developed micro scaffold platform (alginate scaffold encapsulated with bacteria spiked plasma and pH responsive carbon dots). (c) Change in current over time. Inset represents the particular area for current shifts from 0 to 6hrs in the range of reduction potential (-1.0V to -0.5V). (d) Current change observed in different bacterial concentrations over time. Fluorescence Microscopy images of micro scaffolds encapsulating (e) healthy plasma and (f) simulated bacteria stained with acridine orange (green) and Hoechst (blue)	62
Figure 2.3	Growth estimation for the spiked bacteria in human plasma by cyclic voltammetry: Figure 3a-3b represents the voltammograms for different bacterial concentrations ( $10^2$ and $10^4$ ) respectively	63
Figure 2.4	Cyclic voltammograms of $10^2$ CFU/ml bacteria spiked plasma: (a) without alginate microgel and (b) with microgel	63
Figure 2.5	Cyclic voltammograms recorded with the increased incubation time from 0h to 6h in (a) sepsis-negative and (b) sepsis-positive samples.	65
Figure 2.6	Electrochemical analysis of plasma collected from patients (clinical samples): (a) Current change over time in sepsis-negative and sepsis-positive samples. (b) Fluorescence	66

	Microscopy images of microscaffolds encapsulating samples, stained with acridine orange. ROC curves for Epa-Epc and PCT levels for (c) culture-positive infection (d) sepsis-positivity (either culture or qSOFA) and (e) Analysis of culture-negative but ECS-positive samples	
Figure 2.7	Charge quantification. (a) LPS charge in non reducing solution at various concentrations, inset (voltammogram of LPS in non-reducing solution) and (b) Charge quantification of various biological samples	74
Figure 2.8	Electrochemical bacterial classification: (a) Current change observed in bacterial classes over time. (b) Charge observed for bacterial strains. (c) Antibiotic susceptibility analysis of spiked plasma	75
<b>Chapter 3</b>		
Figure 3.1	Physical Characterization of Fabricated Immunosensor: (A) Process of the layer-by-layer biofunctionalization of SPE; (B) Activation of SPE leading to increase in current due to carboxyl groups ; (C) Voltammogram of fabricated immunosensor for each layer deposited; (D) Contact angle for (a) Bare SPE, (b) Immobilized IL-6, (c) Immobilized PCT and (d) Immobilized CRP respectively and (E) SEM images at 30x magnification (a) Bare SPE, (b) Immobilized antibody, (Scale bar: 300 nm) and (c) FESEM image of immobilized antibody at 50x magnification (Scale bar: 500 nm)	96
Figure 3.2	SPE activation contact angle	97
Figure 3.3	FT-IR data for different stages (layer-by-layer) of working electrode functionalization.	97
Figure 3.4	(a) Voltammograms recorded by CV to optimize incubation time for microgels encapsulating biomarkers or biological samples. Microgels were encapsulating 5 pg/mL of PCT and incubated with PCT bSPE in redox solution at different time points and (b) SWV in redox solution for microgels encapsulating sepsis biomarkers with different concentrations	100
Figure 3.5	Voltammograms recorded by CV to optimize incubation time for microgels co-encapsulating biomarkers and nanoprobos. Microgels were co encapsulating 5 pg/mL of PCT and CDs and incubated with PCT bSPE in HBSS solution (pH 7.4) at different time points	101
Figure 3.6	Analytical Performance for Sensitivity and Specificity of the Immunosensors: (A) Scheme for analyzing analytical performance of the Immunosensor; (B) Square wave voltammetry for PCT Biomarker at concentrations varying from	102

	2 pg/mL to 1000 pg/mL; (C) Voltammograms for microgels co-encapsulating CDs and biomarkers (PCT, CRP and IL-6) spiked human plasma ; (D) Relative current change (delta change) observed with cyclic voltammetry at 0 and after 10 mins of incubation, (E) Square wave voltammetry at 0 min and after 10 mins of incubation for microgels encapsulating human plasma spiked with 5 pg/mL of clinical biomarkers.	
Figure 3.7	Electrochemical analysis of the dual responsive immunosensor: (A) Schematic for dual detection platform. (B) Cyclic voltammetry of the host (CRP, IL-6 and PCT) and pathogen (Bacteria) biomarkers in human plasma spiked with bacterial consortium; (C) Square wave voltammetry for current change after 10 mins of incubation, ( <i>inc</i> ) stands for after incubation; (D) Concentration Determination by standard plot for human plasma spiked with bacterial consortium obtained by SWV; and (E) ELISA of the human plasma sample spiked with bacterial consortium.	107
<b>Chapter 4</b>		
Figure 4.1	Preparation and Optimization of Microgels: (A) COMSOL generated model of cell-encapsulated microgel, (B) COSMOL generated model for diffusion across three different size of microgels inside the chip tube compartment; (C) Microscopic images of different sizes of Microgels (Scale 500µm), SEM micrographs of porous microgels showing pores at with scale bar of (D) 100µm and (E) 20µm, (F) Growth curves of Huh-7 cell line cultured over 8 days within three sizes of Microgels by alamar assay and (G) Growth curves of Huh-7 cells cultured over 8 days obtained from Alamar blue assay and pH-sensitive fluorescent carbon dots	128
Figure 4.2	COMSOL simulation of diffusion across three sizes of microgels	129
Figure 4.3	Binary for the SEM in Figure 1E to calculate the pore size	131
Figure 4.4	(A) Fluorescence emission spectra at excitation 500nm for carbon dots (0.5mg/mL) dispersed in PBS at pH 9.5, pH 7.4 and pH 5.5; (B) Fluorescence microscopic images of Carbon dots encapsulated with cells for Cell proliferation and (C) Cytocompatibility assay of Carbon dots using various concentrations from 0.005-1mg/mL using Huh-7 cells	131
Figure 4.5	Evaluating functionality in microgels in a static model: (A) Schematic of 2D and 3D culture platforms for the functionality of Huh-7 cells' where H refers to Huh-7 which are the hepatocellular carcinoma cells and F refers to the Fibroblast	135

	NIH-3T3 cells, (B) Fluorescence microscopic image of albumin production in Huh-7 microgels at day 2, day 6 and day 14 (under 10x magnification, Scale bar 100 $\mu\text{m}$ ), (C) Albumin production in 2D by ELISA assay, (D) Albumin production in 3D conditions by ELISA assay, (E) Relative change in CYP3A4 gene expression from day 2 over 6 days in 2D and over the 14-day culture period in 3D	
Figure 4.6	Functionality of Huh-7 cells encapsulated in microgels in a microfluidic chip. (A) Scheme for Dynamic platform; (B) Albumin change over 14 days in different microgels combination; (C) FGF-2 (Fibroblast growth factor-2) ELISA assay for the combinations (H+F) and (HF) microgels in dynamic condition; (D) Relative change in CYP3A4 gene expression over 14 days and (E) Microscope fluorescent imaging of Huh-7 and NIH-3T3 encapsulated microgel combinations at 2.5x over Day 2, 6 and 14 of culture inside the Culture platform. Cellular dyes used – green-CM-FDA dye and red-CM-DIL dye (Scale 250 $\mu\text{m}$ )	138&139
Figure 4.7	Evaluating the design of microfluidic chip: (A) represents design comprising hexagonal lobular architecture and (B) The rectangular design with 10 inlet pores connecting perpendicularly via microfluidic channels into a central outlet	140
Figure 4.8	(A) Fluorescence microscopic images for dye diffusion under two conditions: static and dynamic; (B) Fluorescence microscopic images for cell-matrix interactions (Phalloidin-TRITC stains the cytoskeleton red and DAPI stains the cell nucleus, scale bar 100 $\mu\text{m}$ ); (C) Albumin change observed on day 2,6 and 14 after treatment with two drugs in different microgel combinations, and (D) Relative change in CYP3A4 gene expression over 14 days in different microgel conditions. (UT-untreated, AC- acetaminophen and DF-diclofenac)	143
<b>Chapter 5</b>		
Figure 5.1	Optimization of vascularized 3D in-vitro liver model: (A) Schematic for different microgel combinations studied for cell positioning to achieve best vasculature; (B) SEM of core-shell microgel (scale bar-2 $\mu\text{m}$ ) ; Rheology of (C) core-shell microgel composite; (D) core solution; (E) shell solution after encapsulating cells; (F) Fluorescence microscopy of microgel combinations (scale bar-10 $\mu\text{m}$ ) when stained with Cell tracker: CM-Dil (Red) for Huh-7 and Hoechst (Blue) for Endothelial cells (HUVECs) and (G) Fluorescence microscopy of microgel combinations (scale bar-10 $\mu\text{m}$ ) when stained with Hoechst (Blue) for Endothelial cells (HUVECs) to observe movement of	161

	endothelial cells.	
Figure 5.2	Optimization of regenerative vascularized 3D in-vitro liver model. (A) Fluorescence microscopic images at 2.5x magnification for different microgel combinations to cell-cell interactions between ECs:HUVECs+LECs (stained with Hoechst, blue) and Huh-7 (stained with Cell Tracker: CM-dil, red), scale bar 10 $\mu\text{m}$ ; (B) Fluorescence microscopic images at 2.5x magnification for different microgel combinations study vascularization for 14 days time period, ECs stained with Hoechst (blue), scale bar 10 $\mu\text{m}$ ; (C) Fluorescence microscopic images at higher magnification (10x) to observe filopodia-like extrusions during vascular networks formation over 21 days time; ELISA assay for regenerative markers (D) Hepatocyte growth factor (HGF); (E) Interleukin-8 (IL-8) and (F) Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)	164
Figure 5.3	Bacterial cells infected 3D liver in-vitro model. (A) Schematic for different combinations studied to understand hepatocellular function with the onset of bacterial infection; (B) Evaluation of albumin levels in different combinations over 14 days; Fluorescence microscopy for internal bacterial infection in (C) VEGF+ culture media condition and (D) VEGF- culture media condition, scale bar 10 $\mu\text{m}$ where bacterial cells are stained with acridine orange (green), Huh-7 stained with cell tracker CM-Dil (red) and ECs stained with Hoechst (blue)	167
Figure 5.4	Quantification of early markers (IL-6, CRP and PCT) associated with bacterial infections. (A) Standard curve plot by SWV; (B) protein concentration quantification by SWV over 14 days in microgel system and (C) Validation of obtained concentration for IL-6, CRP and PCT with commercially available ELISA kits	169

## List of Tables

Table Number	Title	Page No.
<b>Chapter 1</b>		
Table 1.1	Biomarkers studied for sepsis in liver cirrhotic patients	10-11
Table 1.2	Electrochemical Platforms for Sepsis host-pathogen biomarker detection. Abbreviation: EIS (Electrochemical Impedance Spectroscopy), CV (Cyclic Voltammetry), DPV (Differential Pulse Voltammetry), CA (Chronoamperometry) and SWV (Square Wave Voltammetry)	18-20
<b>Chapter 2</b>		
Table 2.1	Commercially available devices for sepsis	53-54
Table 2.2	Primer Designing (Target primers to detect pathogenic microbes in blood)	67-68
Table 2.3	Clinical attributes of culture-positive and negative sepsis in patients with liver cirrhosis	68-69
Table 2.4	Clinical attributes of the electrochemical sensor (ECS) -positive and negative sepsis in patients with liver cirrhosis	70-71
Table 2.5	Sensitivity and specificity of Epa-Epc and PCT levels for confirmed sepsis	72
Table 2.6	Sensitivity and specificity of Epa-Epc and PCT levels for confirmed and suspected sepsis	72
Table 2.7	Electrochemical analysis for Antibiotic susceptibility at different concentrations of antibiotics in the plasma spiked with a bacterial cocktail	76
<b>Chapter 3</b>		
Table 3.1	Comparative study of Biomarkers	88
Table 3.2	Peak-to peak separation ( $\Delta E$ ) and Anodic to cathodic peak ratio ( $I_{pa}/I_{pc}$ ) observed after the bio-functionalization steps of SPE	94
Table 3.3	EDX data for layer-by-layer functionalization of screen-printed electrodes	97
Table 3.3	Current peaks recorded by SWV for microgels encapsulating different biomarker concentrations	100-101
Table 3.4	Cross- reactivity and Precision (RSD%) of the interferents with the developed immunosensing platform	103

Table 3.5	Stability assay for the developed immunosensor platform by SWV	104
<b>Chapter 4</b>		
Table 4.1	Average diameters for various sizes of microgels fabricated using electrospraying	130
Table 4.2	Albumin (pg/mL) production in HF conditions using different cell density ratios over 8 days time-period	132
Table 4.3	Distance of Huh-7 (red) to nearest NIH-3T3 (green fluorescence) in two different sets of microgels as chip 1 and chip 2 using FIJI image analyzer distance tool	140

## List of Schemes

Scheme Number	Scheme Title	Page No.
<b>Chapter 1</b>		
Scheme 1.1.	Schematic for electrochemical detection of sepsis in liver cirrhotic patients: (A) Summary of bacterial sepsis detection techniques and (B) Principle of biomarker detection by electrochemical method.	5
<b>Chapter 2</b>		
Scheme 2.1	Schematic representation of the platform for early bacterial sepsis detection.	56
Scheme 2.2	Scheme for classification of bacteria by exploiting the presence and absence of cell wall.	75
<b>Chapter 3</b>		
Scheme 3.1	Electrochemical 3D Microgel based Immunosensor for Dual Sepsis Marker Detection.	90
<b>Chapter 4</b>		
Scheme 4.1	Schematic for modular co-culture microfluidic platform.	120
<b>Chapter 5</b>		
Scheme 5.1	3D <i>in-vitro</i> vascularized liver model that mimics regenerative responses.	154

## List of Abbreviations

---

CAIDS	Cirrhosis-associated immune dysfunction
PoC	Point-of-care
CRP	C-Reactive Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IL-6	Interleukin-6
TNF- $\alpha$	Tumour Necrosis Factor- $\alpha$
HMG-B1	High mobility group box-1
SuPAR	Soluble urokinase plasminogen activator
PCT	Procalcitonin
SPR	Surface Plasmon Resonance
CV	Cyclic Voltammetry
SWV	Square Wave Voltammetry
DPV	Differential Pulse Voltammetry
CA	Chronoamperometry
MIPS	Molecularity Imprinted Polymers
EC	Electrochemical
DETeCt	Direct Electrochemical Technique Targeting Sepsis
PAMPs	Pathogen-Associated molecular patterns
MNPs	Magnetic Nanoparticles
SPE-C	Screen-printed carbon electrodes
LPS	Lipopolysaccharides
EIS	Electrochemical Impedance Spectroscopy
DILI	Disease-induced liver injury
NASH	Non-alcoholic Steatohepatitis
HBV	Hepatitis B virus
EGF	Epidermal Growth Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor

ECM	Extracellular Matrix
LFTs	Liver function tests
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
NPC	Non-parenchymal cells
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
BSA	Bovine Serum Albumin
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
ECS	Electrochemical sensor
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
LoD	Limit of Detection
ROC	Region of curve
NLR	Neutrophile to Lymphocyte Ratio
SOFA	Sequential organ failure assessment
LTA	Lactic acid
WE	Working electrode
RE	Reference electrode
CE	Counter electrode
CB	Carbonate Buffer
NHS	N-hydroxy succiniamide
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl carbodiimide
SEM	Scanning Electron Microscopy
LoQ	Limit of Quantification
FESEM	Field Emission Scanning Electron Microscopy
RT	Room Temperature
TEM	Transmission Electron Microscopy
DPBS	Dulbecco's Phosphate buffered saline
FBS	Fetal Bovine Serum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
HBSS	Hank's Balanced Salt Medium
NCCS	National Centre for Cell Sciences
OoC	Organ-on-a-chip

SD	Standard deviation
CD	Carbon dots
PoCT	Point-of-Care Testing