

بهینه‌سازی بررسی میزان همانندسازی ویروس کمبود ایمنی انسانی تیپ یک با استفاده از ویرونی‌های با قابلیت یک سیکل تکثیر

رضوان ذبیح‌اللهی^۱، مریم نور محمدی^۲، روح‌الله وهاب‌پور^۳، سید مهدی سادات^۴، آذر فرهنگ‌اصفهانی^۴، راحله نمازی^۲، محمدرضا آقاصادقی^۵، منصور صالحی^۶، سید داور سیادت^۵، سعید رضا نداف^۷

^۱ دانشجوی پزشکی، گروه هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور تهران

^۲ کارشناس، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

^۳ کارشناس ارشد، گروه هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور تهران

^۴ دانشجوی کارشناس ارشد و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد فلاورجان

^۵ استادیار، گروه هیپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور تهران

^۶ دانشیار، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

^۷ استادیار، گروه انگل‌شناسی، انستیتو پاستور تهران

چکیده

سابقه و هدف: ویرونی مربوط به ویروس کمبود ایمنی انسانی (HIV) با قابلیت همانندسازی در پژوهش‌های مربوط به HIV مانند پژوهش‌هایی با هدف یافتن ترکیبات ضد ویروس HIV جدید مورد نیاز است. در این مطالعه، همانندسازی HIV-1 با استفاده از ویرونی‌های با قابلیت یک سیکل تکثیر (SCR) انجام شد.

روش بررسی: ویرونی SCR به وسیله ترانسفکت کردن سلول‌های HEK293T با پلاسمیدهای pmzNL4-3، pSPAX2 و pMD2G تولید شد. سلول‌های هدف HEK با مقادیر متفاوت از ویروس SCR آلوده شده و میزان p24 مایع رویی سلول با p24 ELISA اندازه‌گیری شد. در ادامه، اثر ضد ویروسی HIV-1 دو داروی شناخته شده ایدز به نام‌های نویراپین و ایندیناویر به عنوان کنترل مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: همانندسازی مناسب ویرونی‌های SCR بر روی سلول‌های هدف HEK با تیتر شروع کننده ۶۰۰ ng P24 ویروس بود. افزایش p24 ۲۴ ساعت پس از آلودگی قابل سنجش بود و پس از گذشت ۴۸ ساعت به حد اکثر مقدار رسید. غلظتی از داروهای نویراپین و ایندیناویر که ۵۰ و ۹۵ درصد توان بازداري HIV-1 (IC50 و IC95) را داشتند، به ترتیب حدود ۵۰ و ۲۵ نانو مولار بود.

نتیجه‌گیری: میزان اثر ضد ویروسی دو داروی نویراپین و ایندیناویر نشان دهنده دقت مناسب این روش برای سنجش اثر ضد HIV-1 ترکیبات مختلف است. توان همانندسازی یک دوره‌ای HIV SCR باعث افزایش امنیت زیستی روش ابداعی در این مطالعه می‌باشد.

واژگان کلیدی: ویروس کمبود ایمنی انسانی، ویرونی‌های با قابلیت یک سیکل تکثیر، میزان همانندسازی، ایمنی زیستی.

مقدمه

ابتلا به ویروس کمبود ایمنی انسانی (HIV) باعث ایجاد سندرم نقص ایمنی اکتسابی (AIDS) می‌شود. ایدز بیماری

عفونی مزمنی است که با کاهش پیشرونده تعداد سلول‌های هدف CD4⁺ T، سبب بروز عفونت‌های فرصت‌طلب و تومورها و در نتیجه منجر به مرگ در میزبان می‌شود (۱، ۲). به دلیل بار اقتصادی و بهداشتی سنگینی که HIV به نظام سلامت جهانی وارد کرده است، تحقیقات روی این ویروس در تمامی ابعاد ادامه دارد و از این رو پژوهش در زمینه واکسن و

آدرس نویسنده مسئول: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، گروه هیپاتیت و ایدز،

رضوان ذبیح‌اللهی (email: Rezvan_z_m@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۱۱/۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۰/۵/۱۵

کننده گلیکوپروتئین سطحی (VSV) vesicular stomatitis virus می‌باشد (۹).

مواد و روشها

در این مطالعه از نویراپین و ایندیناویر که از داروهای ضد ویروس HIV مورد استفاده در برنامه درمانی کشوری می‌باشند، به عنوان کنترل استفاده شد. این دو دارو در غلظت 20mM با حل نمودن قرص‌های خریداری شده در DMSO (دی متیل سولفوکساید) تهیه شدند و در شرایط ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای انجام تست‌های مربوطه، رقت‌های مختلفی از دارو تهیه شد و غلظت نهایی مورد آزمایش با افزودن ۱ درصد از رقت اولیه دارو به محیط کشت استفاده شد و غلظت نهایی DMSO به ۱ درصد رسانده شد. همچنین از DMSO با غلظت نهایی ۱ درصد به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

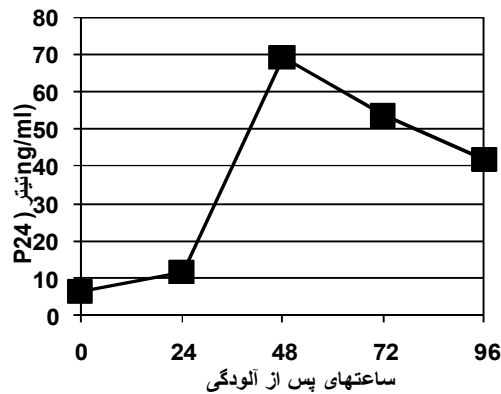
در این مطالعه از سلول‌های HEK293T انسانی استفاده شد که از کلیه جنین انسان جدا و از بانک سلول انستیتو پاستور ایران گرفته شده‌اند. سلول‌های HEK در محیط DMEM به همراه ۱۵ درصد FBS به همراه L-Glutamine، پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شد (۸). در مرحله ترانسفکشن به محیط سلول‌های HEK، HEPES افزوده شد و سلول‌ها در انکوباتور CO₂ تحت فشار ۵ درصد CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای تولید ویروئین‌های HIV-1 SCR از پلاسمید pSPAX.2، pmzNL4-3 و پلاسمید pMD2.G استفاده شد (۹، ۱۰). پلاسمیدها با نسبت‌های مشخص، هم‌زمان به سلول‌های HEK293T ترانسفکت شدند. ترانسفکشن توسط کیت پلیفکت (Qiagen) و طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده در پلیت‌های ۶ چاهکی انجام گرفت. در مرحله ترانسفکشن، HEPES به میزان ۲۵ میکرومتر به محیط سلول‌ها افزوده شد. مایع رویی سلول حاوی ویروس در ساعت‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از آلودگی جمع‌آوری و سپس محیط تازه به چاهک‌های کشت اضافه شد. محیط‌های حاوی ویروس باهم مخلوط و پس از فیلتر شدن با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۱). بخشی از ویروس تولید شده به وسیله سانتریفیوژ با دور بالا تغلیظ شد. برای تغلیظ ویروس‌ها، محیط کشت حاوی ویروس فیلتر شده برای ۲ ساعت با نیروی ۶۰x۱۰^۳g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ مایع روی رسوب

داروهای بازدارنده ویروس HIV از اهمیت بالایی برخوردار است. داروهای ضد ویروسی تنها راه کنترل بیماری AIDS در حال حاضر می‌باشند و به همین جهت پژوهش برای یافتن داروهای ضد ویروسی موثر روی HIV ارزشمند می‌باشد (۳). پس از اتصال ویروئین‌های HIV به سطح سلول‌های هدف خویش که با کمک گلیکوپروتئین‌های سطحی خود (gp120، gp40) انجام می‌پذیرد و به دنبال اتصال آنها به CD4 و CXCR4 در سطح سلول هدف، پوشینه ویروسی با غشای سلول هدف ادغام می‌شود. نسخه‌برداری از RNA ویروس و ساخت DNA پروویروسی توسط آنزیم RT، در سیتوپلاسم سلول صورت می‌گیرد و در مراحل بعدی کمپلکس قبل از الحاق یا PIC از منافذ هسته عبور کرده و پس از ورود به هسته به طور تصادفی در بخشی از DNA سلول وارد می‌شود (۴). mRNAهای ویروسی به وسیله سیستم رونویسی سلول از روی پروویروسی رونویسی شده و در ادامه توسط سیستم‌های سلولی پروتئین‌های ویروسی ساخته می‌شوند. RNA ویروسی به همراه پروتئین‌های ویروسی gag-pol، gag، ENV و پروتئین‌های کمکی، اجسام ویروسی جدید را تشکیل می‌دهند (۵).

برای بررسی اثر هر ترکیب یا مداخله‌ای بر روی همانندسازی ویروئین‌های HIV-1 وجود ویروئین‌های HIV-1 با قابلیت آلوده سازی لازم می‌باشد (۶، ۷). انجام همانندسازی ویروس HIV-1 در حضور شرایط و یا ترکیبات مورد آزمایش یکی از متداول‌ترین راه‌های بررسی فرضیات در زمینه HIV می‌باشد (۷). از سوی دیگر کار با ویروئین‌های وحشی HIV نیازمند شرایط ایمنی زیستی بالایی می‌باشد. نیاز به آزمایشگاهی با ایمنی زیستی بالا باعث شده است که انجام چنین مطالعات HIV محدود باشد. در این مطالعه، هدف ابداع شیوه جدیدی برای انجام مطالعات وابسته به همانندسازی ویروس HIV بود، به طوری که از نظر ایمنی زیستی، خطر آلوده کنندگی کمتری وجود داشته باشد. در این مطالعه از ویروئین‌های HIV-1 با قابلیت یک سیکل همانندسازی SCR (single cycle replicable) برای بهینه‌سازی ایمنی‌زیستی مطالعات بررسی میزان همانندسازی و بررسی میزان تولید و بلوغ ویروس HIV-1 استفاده شد (۸، ۹). برای تولید ویروئین‌های SCR پلاسمید pmzNL4-3 که تولید کننده ویروئین‌های جهش یافته و غیر فعال HIV-1 می‌باشد به همراه دو پلاسمید pSPAX و pMD2G به سلول‌های کلیه جنین انسان HEK ترانسفکت می‌شود. پلاسمید pSPAX تولید کننده تمامی پروتئین‌های ساختاری و آنزیم‌های HIV-1 و pMD2G تولید

سپس کاهش یافت. حداکثر محتوای تجمعی میزان p24 مایع رویی سلول‌ها ۷۲ ساعت پس از آلودگی بود. از این رو در تست بهینه‌سازی بررسی میزان همانندسازی، سنجش میزان p24 مایع رویی سلول ۷۲ ساعت پس از آلودگی مورد ارزیابی قرار گرفت.



نمودار ۱- سنجش تیتراژ p24 محیط رویی کشت سلولی HEK پس از آلودگی به ویریون‌های SCR. تولید p24 در روز اول پس از آلودگی قابل سنجش بوده و پس از ۴۸ ساعت به حداکثر میزان خود رسیده و از روز چهارم به بعد کاهش یافته است.

میزان همانندسازی SCR HIV-1 با توجه به MOI شروع کننده

سلول‌های HKE با میزان‌های متفاوت MOI (Multiplicity Of Infection) از ویریون‌های SCR که با VSVG سودوتایپ شده بودند آلوده شدند. محیط رویی سلول‌های آلوده شده به ویروس ۷۲ ساعت بعد از آلودگی از لحاظ میزان p24 توسط روش الیزا بررسی شد. همان‌طور که در نمودار ۲ دیده می‌شود نسبت افزایش همانندسازی به افزایش میزان ویروس اولیه کاملاً خطی است. این امر دقت این تست را برای سنجش میزان همانندسازی نشان می‌دهد چرا که هر عاملی که بر MOI اثر بگذارد، به شکل خطی میزان تولید P24 را کاهش خواهد داد.

سنجش بازدارندگی همانندسازی به وسیله SCR HIV-1
بر اساس نتایج ذکر شده فوق، میزان مناسب ویروس برای شروع همانندسازی (۶۰۰ نانوگرم p24) و زمان مناسب (۷۲ ساعت) برای اندازه‌گیری p24 انتخاب شد. برای آزمودن فرایند سنجش همانندسازی به وسیله SCR HIV-1، اثر ضد ویروسی یکی از داروهای ضد رونوشت بردار معکوس (RT) HIV-1 با

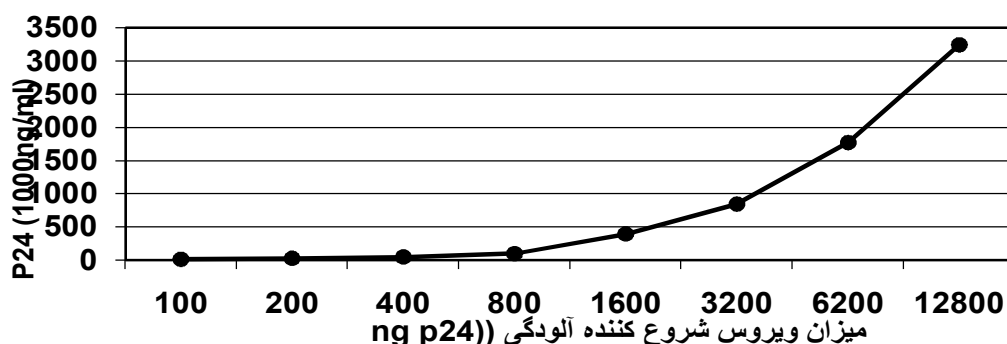
ویروسی تخلیه شده و رسوب در RPMI با نسبت ۱:۳۰ محیط اولیه توسط gentle vortex بمدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حل شد (۱۲). برای تولید ویروس به منظور استفاده در سنجش میزان تولید و بلوغ، ویریون‌های SCR در چاهک‌های پلیت ۲۴ خانه‌ای تولید شدند. به این منظور 70×10^3 سلول HEK توسط ۴۰۰ نانوگرم پلاسמיד مورد استفاده برای تولید HIV SCR در حضور ۴ میکرولیتر پلیفکت ترانسفکت شدند. حجم زمان ترانسفکشن ۳۰۰ میکرولیتر و حجم کمپلکس DNA اضافه شده ۱۲۴ میکرولیتر بود. پس از اتمام ترانسفکشن، ۸۰۰ میکرولیتر محیط کامل حاوی ترکیب مورد آزمایش به سلول‌ها افزوده شد. محیط کشت حاوی ویروس، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن جمع‌آوری شد و میزان ویروس تخلیص شده توسط ELISA p24 capture (Biomerieux) طبق پروتکل کیت سنجش شد.

برای بررسی میزان همانندسازی ویریون‌های SCR HIV-1 سودوتایپ شده با VSVG (stomatitis virus vesicular surface glycoprotein) از سلول‌های HEK استفاده شد. تعداد 60×10^3 سلول HEK در هر چاهک از پلیت ۲۴ خانه‌ای حاوی ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت قرار داده شدند. به هر چاهک ۶۰۰ نانوگرم P24 و یا میزان‌های متفاوت از ۱۰۰ تا ۱۲۸۰۰ نانوگرم p24 ویروس HIV SCR، بسته به نوع مطالعه، اضافه شد. پس از ۵ ساعت سلول‌ها دو بار درون چاهک به وسیله DMEM ۱۰ درصد FBS شستشو داده شدند (۷، ۱۳). با توجه به نوع مطالعه، هر ۲۴ ساعت و یا در یک نوبت در ۷۲ ساعت محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری شد. در هر بار جمع‌آوری مایع رویی سلول، کل محیط کشت درون چاهک با محیط تازه جایگزین شد. میزان P24 مایع رویی سلول به وسیله ELISA capture (Biomerieux) برطبق پروتکل شرکت سازنده سنجیده شد.

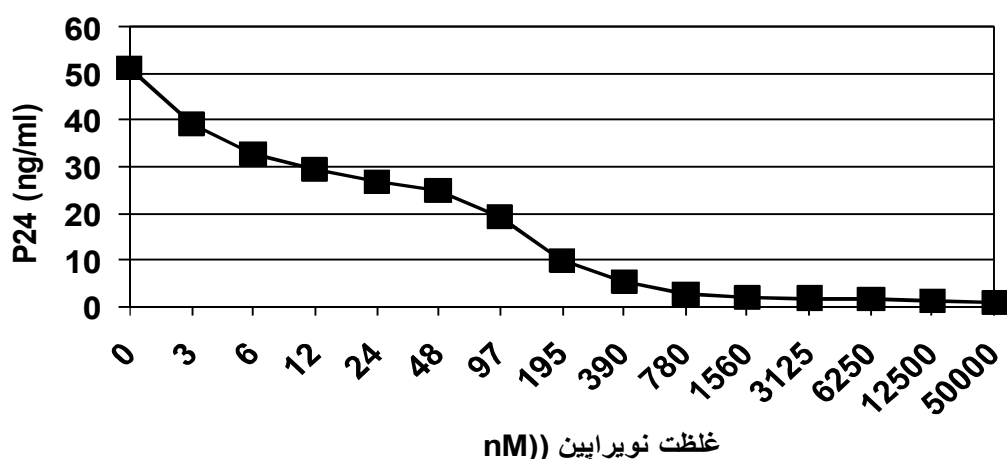
یافته‌ها

هماندسازی SCR HIV-1 در روزهای پس از آلوده سازی

در این مطالعه، میزان همانندسازی ویریون‌های SCR HIV-1 سودوتایپ شده با VSVG بر روی سلول‌های HEK در روزهای پس از آلودگی با ویروس بررسی شد. همان‌طور که در نمودار ۱ نشان داده شده است حداکثر تولید p24 در سلول‌های آلوده شده به ویریون‌های SCR، ۴۸ ساعت پس از آلودگی بود. میزان ترشح p24 از روز اول پس از آلودگی سلول‌ها به SCR HIV-1 شروع و دو روز پس از آلودگی به حداکثر خود رسید و



نمودار ۲- همانندسازی ویروس SCR HIV-1 سودوتا پ شده با VSVG با MOI مختلف بر روی سلولهای HEK. نتایج افزایش کاملاً خطی میزان همانندسازی را با افزایش میزان ویروس شروع کننده نشان می دهد. میزان همانندسازی با استفاده از سنجش میزان p24 سه روز بعد از آلودگی مشخص شده است.



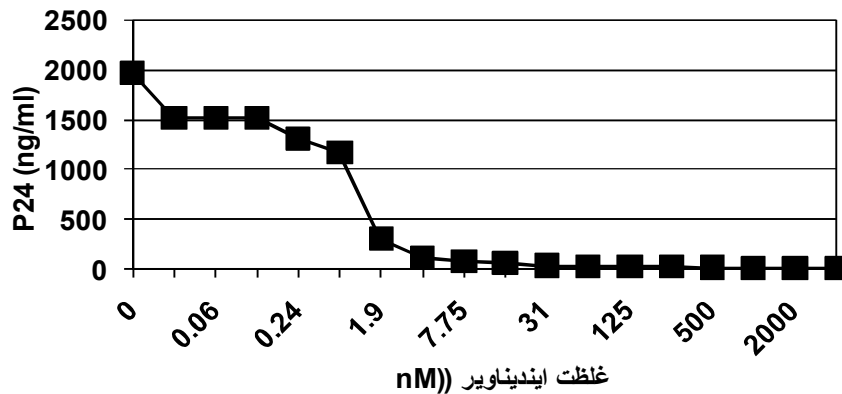
نمودار ۳- سنجش میزان همانند سازی ویرونیهای SCR در حضور غلظتهای مختلف داروی ضد ویروسی نویراپین. همانطور که مشاهده می شود سیستم سنجش همانندسازی بر اساس SCR HIV-1 به خوبی اثر ضد ویروسی این دارو را در غلظتهای مختلف نشان می دهد. از داده های مذکور به راحتی میتوان توان ضد ویروسی این دارو را در غلظتهای مختلف محاسبه نمود.

سلولهای HEK هدف منتقل شد و برای آزمودن این سنجش، از داروی ایندیناویر که بازدارنده آنزیم پروتئاز ویروس HIV می باشد، استفاده شد. ویرونیهای SCR در چاهکهای مختلف و در حضور غلظتهای مختلف داروی ایندیناویر تولید شدند. سپس میزان برابر محیطهای حاوی ویروس از روی سلولهای تولید کننده ویروس SCR به روی سلولهای هدف منتقل شد. پس از گذشت سه روز، میزان p24 محیط رویی سلولها با استفاده از ELISA p24 سنجش شد (نمودار ۴). همان گونه که در نمودار ۴ مشاهده می شود بررسی اثر ضد ویروسی ترکیب ایندیناویر در غلظتهای مختلف قابل اندازه گیری است.

نام نویراپین با استفاده از این سیستم بهینه شده بررسی شد. میزان همانندسازی ویرونیهای SCR در حضور غلظتهای مختلف نویراپین به وسیله روش ابداعی در این مطالعه اندازه گیری شد که نتایج آن در نمودار ۳ نشان داده شده است.

سنجش میزان تولید و بلوغ ویرونیهای HIV-1 با استفاده از SCR HIV-1

به این منظور توانایی همانندسازی ویرونیهای SCR HIV-1 تولید شده در حضور ترکیب مورد نظر سنجیده شد و از این رو ویرونیهای SCR سودوتا پ شده با VSVG در حضور ترکیب تولید و جمع آوری شدند. محیط رویی حاوی ویروس به روی



نمودار ۴- میزان بازدارندگی داروی ایندیناویر بر روی بلوغ ویریونهای HIV-1 در غلظت‌های مختلف. این داده‌ها با استفاده از فرایند سنجش میزان تولید و بلوغ مبتنی بر SCR HIV-1 به دست آمده و با استفاده از این داده‌ها می‌توان توان بازدارندگی ایندیناویر بر بلوغ ویروس را غلظت‌های مختلف دارو محاسبه نمود.

استفاده می‌شود. در این شرایط می‌توان اثر بازدارنده یا افزایشنده ترکیب را بر روی همانندسازی ویروس بررسی نمود (۲۰-۱۵). همانند ترکیبات صنعتی، بررسی اثرات ضد HIV عصاره‌های طبیعی نیز نیازمند کار با ویروس زنده است (۲۱). از سوی دیگر استفاده از روش‌های مشابه برای بررسی اثر شرایط و مداخله‌گرهای مختلف بر همانندسازی ویروس HIV لازم است. انجام تمامی این مطالعات نیازمند به ویریون‌های زنده HIV می‌باشد که استفاده از آنها مستلزم شرایط ایمنی زیستی بالایی می‌باشد. در این مطالعه فرایند کلاسیک مطالعه میزان همانندسازی ویروس HIV-1 شامل تولید و بلوغ ویریون‌های جدید بر اساس استفاده از ویریون‌های SCR به جای ویروس وحشی بهینه‌سازی شده است.

نتایج مطالعه جاری کارآمدی آلوده شدن سلول‌های HEK به ویریون‌های SCR-VSVG را تایید نموده است. انجام آلوده سازی سلول‌های هدف با میزان‌های متفاوت از ویروس شروع کننده SCR نشان دهنده افزایش کاملاً خطی میزان p24 است. این نتایج توان بالقوه و مناسب ویریون‌های SCR را برای انجام بررسی میزان همانندسازی نشان می‌دهند. بر اساس نتایج حاضر، بهترین تیترو ویریون‌های SCR شروع کننده آلوده سازی و بهترین زمان برای اتمام آزمایش محاسبه شده است. میزان بهینه ویروس برای شروع آلودگی ۶۰۰ نانوگرم p24 و بهترین زمان برای سنجش میزان p24 مایع رویی سلول ۷۲ ساعت پس از آلودگی بود. با این شرایط میزان همانندسازی ویریون‌های SCR HIV در طی یک سیکل سنجیده می‌شود.

بحث

تلاش در جهت یافتن راه‌های درمان جدید بیماری ایدز از اهمیت ویژه‌ای در انجام پژوهش‌های HIV برخوردار است. ایجاد مقاومت‌های دارویی جدید در میان سوش‌های بالینی HIV، انگیزه برای یافتن ترکیبات جدید ضد این ویروس را بیشتر کرده است (۱۴) و از سوی دیگر به دلیل مشکلات ایمنی زیستی کار با ویروس وحشی، محدودیت شدیدی در مراکز تحقیقاتی برای انجام تحقیقات وابسته به همانندسازی ویریون‌های HIV وجود دارد. در مطالعه حاضر، برخی از روش‌های ویروس شناسی HIV-1 با استفاده از ویریون‌های SCR به گونه‌ای بهینه‌سازی شده‌اند که از ایمنی‌زیستی بالاتری بهره‌مند شوند. ویریون‌های HIV-1 SCR تولید شده به وسیله پروویروس‌های بدون رونوشت بردار معکوس (RT Negative) توانایی تکثیر برای یک سیکل کامل را دارا می‌باشند و در عین حال ویریون‌های نسل دوم حاصل از همانندسازی آنها غیرفعال می‌باشند (۹، ۱۰). به دلیل غیرفعال بودن ویریون‌های حاصل از همانندسازی HIV-1 SCR، این ویریون‌ها از ایمنی زیستی بالایی برخوردارند که آنها را برای استفاده در مطالعات ویروس شناسی HIV-1 مناسب می‌نماید. استفاده از ویریون‌های زنده برای انجام طیف وسیعی از مطالعات مربوط به HIV الزامی می‌باشد. به عنوان مثال، معمولاً برای سنجش اثر ترکیبات صنعتی و طبیعی بر روی تکثیر ویروس HIV از روش بررسی میزان همانندسازی

ویریون‌ها است. با استفاده از نتایج این مطالعه بهینه‌سازی شده بر اساس استفاده از ویریون‌های SCR HIV-1، می‌توان توان ضد ویروسی ایندیناویر را در غلظت‌های متفاوت محاسبه نمود. توانایی ۹۵ درصد بازدارندگی (IC₉₅) محاسبه شده برای ایندیناویر ۲۵ nM بود که نزدیک به اعداد شناخته شده از این ترکیب می‌باشد (۲۳).

با توجه به غیرفعال بودن ویریون‌های حاصل از همانندسازی SCR HIV-1، مزیت عمده روش ابداعی در این مطالعه درجه بالای ایمنی زیستی و همچنین سهولت انجام می‌باشد. در عین حال با این روش می‌توان اثر ضدویروسی هر ترکیب یا مداخله‌ای را پس از ورود ویروس به سلول هدف تا خروج ویریون‌های جدید بررسی نمود. اثر ضد ویروسی دو داروی شناخته شده ایدز، شامل نویراپین و ایندیناویر، در این مطالعه نشان دهنده دقت بالای روش بهینه‌سازی شده می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از نتایج حاصل از طرح پژوهشی گروه هپاتیت و ایدز انسیتو پاستور ایران می‌باشد.

برای سنجش دقت روش ابداع شده در این مطالعه توان ضد HIV دو داروی نویراپین و ایندیناویر به وسیله این روش بررسی شد. بر اساس داده‌های به دست آمده به وسیله روش ابداع شده در این مطالعه (نمودار ۳) پتانسیل ضدویروسی نویراپین در غلظت‌های مختلف به دست آمد و توان ۵۰ درصد بازدارندگی (IC₅₀) برای این دارو حدود ۵۰ nM محاسبه شد. این مقدار توان ضد ویروسی که به وسیله روش ابداعی در این مطالعه بدست آمده است، بسیار نزدیک به میزان شناخته شده برای ترکیب نویراپین می‌باشد (۲۲).

همچنین در این مطالعه روشی ارائه شده است که می‌تواند میزان تولید و بلوغ ویریون‌های HIV-1 را با استفاده از ویریون‌های SCR بررسی کند. در این راستا میزان توان همانندسازی ویریون‌های SCR تولید شده در حضور ترکیبات ذکر شده سنجیده شد. با اندازه‌گیری میزان تولید ویریون‌های SCR در حضور ترکیب مورد نظر می‌توان بین توان بازدارندگی تولید و بلوغ افتراق گذاشت. بر این اساس اثر حضور ترکیب ایندیناویر که داروی شناخته شده ضد HIV-1 و بازدارنده پروتئاز ویروسی می‌باشد بر تولید و بلوغ ویریون‌های SCR HIV سنجیده شد. همانطور که در نمودار ۴ نشان شده است، ایندیناویر اثری بر تولید ویریون‌ها نداشته، ولی بازدارنده بلوغ

REFERENCES

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220: 868-71.
2. Bartz SR, Emerman M. Human immunodeficiency virus type 1 Tat induces apoptosis and increases sensitivity to apoptotic signals by upregulating FLICE/caspase-8. *J Virol* 1999; 73: 1956-63.
3. Katzman M, Sudol M, Pufnock JS, Zeto S, Skinner LM. Mapping target site selection for the non-specific nuclease activities of retroviral integrase. *Virus Res* 2000; 66: 87-100.
4. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* 2010; 46: 5-14.
5. Sakuragi J, Iwamoto A, Shioda T. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J Viro* 2002; 176: 959-67.
6. H Golding, Aliberti J, King LR, Manischewitz J, Andersen J, Valenzuela J, et al. Inhibition of HIV-1 infection by a CCR5-binding cyclophilin from *Toxoplasma gondii*. *Blood* 2008; 102: 3280-86.
7. Svarovskaia ES, Barr R, Zhang X, Pais GCG, Marchand C, Pommier Y, et al. Azido containing diketo acid derivatives inhibit human immunodeficiency virus type 1 integrase in vivo and influence the frequency of deletions at two-long-terminal-repeat-circle junctions. *J Virol* 2004; 78: 3210-22.
8. Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, et al. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 1986; 59: 284-91.
9. Sadat SM, Zabihollahi R, Vahabpour R, Azadmanesh K, Javadi F, Siadat SD, et al. Designing and biological evaluation of single cycle replicable HIV-1 system as a potential vaccine strategy. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: S334.
10. Rezaei A, Zabihollahi R, Salehi M, Moghim S, Tamizifar H, Yazdanpanahi N, et al. Designing a non-virulent HIV-1 strain: potential implications for vaccine and experimental research. *J Res Med Sci* 2007; 12: 227-34.

11. Campbell EM, Perez O, Melar M, Hope TJ. Labeling HIV-1 virions with two fluorescent proteins allows identification of virions that have productively entered the target cell. *Virology* 2007; 360: 286-93.
12. Cavrois M, Neidleman J, Yonemoto W, Fenard D, Greene WC. HIV-1 virion fusion assay: uncoating not required and no effect of Nef on fusion. *Virology* 2004; 328: 36-44.
13. Morgan JR, LeDoux JM, Snow RG, Tompkins RG, Yarmush ML. Retrovirus infection: effect of time and target cell number. *J Virol* 1995; 69: 6994-7000.
14. Wainberg MA, Martinez-Cajas JL. Sequencing of therapy to avoid resistance and the need for new antiretroviral drugs in the treatment of HIV disease. *Infect Disord Drug Targets* 2009; 9: 172-90.
15. Zhan P, Liu X, Fang Z, Pannecouque C, Clercq ED. 1,2,3-Selenadiazole thioacetanilides: Synthesis and anti-HIV activity evaluation. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 6374-79.
16. Liang Y, Sharon A, Grier JP, Rapp KL, Schinazi RF, Chu CK. 5'-O-Aliphatic and amino acid ester prodrugs of (-)-beta-D-(2R,4R)-dioxolane-thymine (DOT): synthesis, anti-HIV activity, cytotoxicity and stability studies. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 1404-409.
17. Qian K, Yu D, Chen CH, Huang L, Morris-Natschke SL, Nitz TJ, et al. Anti-AIDS agents. 78. Design, synthesis, metabolic stability assessment, and antiviral evaluation of novel betulinic acid derivatives as potent anti-human immunodeficiency virus (HIV) agents. *J Med Chem* 2009; 52: 3248-58.
18. Xiong YZ, Hu HR, Chen FE, Balzarini J, Pannecouque C, de Clercq E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (Part 18): synthesis and anti-HIV activity of 4-allylamino or 4-azido substituted diaryltriazines. *Yao Xue Xue Bao* 2009; 44: 145-49.
19. Zhan P, Liu X, Li Z, Fang Z, Li Z, Wang D, Pannecouque C, Clercq ED. Novel 1,2,3-thiadiazole derivatives as HIV-1 NNRTIs with improved potency: Synthesis and preliminary SAR studies. *Bioorg Med Chem* 2009; 17: 5920-27.
20. Beck Z, Kis A, Berényi E, Kovács P, Fésüs L, Aradi J. 4-Thio-uridylate (UD29) interferes with the function of protein -SH and inhibits HIV replication in vitro. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 343-47.
21. Li XN, Pu JX, Du X, Yang LM, An HM, Lei C, et al. Lignans with anti-HIV activity from *Schisandra propinqua* var. *sinensis*. *J Nat Prod* 2009; 72: 1133-41.
22. Lu X, Chen Y, Guo Y, Liu Z, Shi Y, Xu Y, et al. The design and synthesis of N-1-alkylated-5-aminoarylalkylsubstituted-6-methyluracils as potential non-nucleoside HIV-1 RT inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2007; 15: 7399-407.
23. Giampiero P, Andrea F, Giuditta C, Julianna L, and Franco L. Complementary Antiviral Efficacy of Hydroxyurea and Protease Inhibitors in Human Immunodeficiency Virus-Infected Dendritic Cells and Lymphocytes. *J Virol* 2002; 76: 2274-78.