

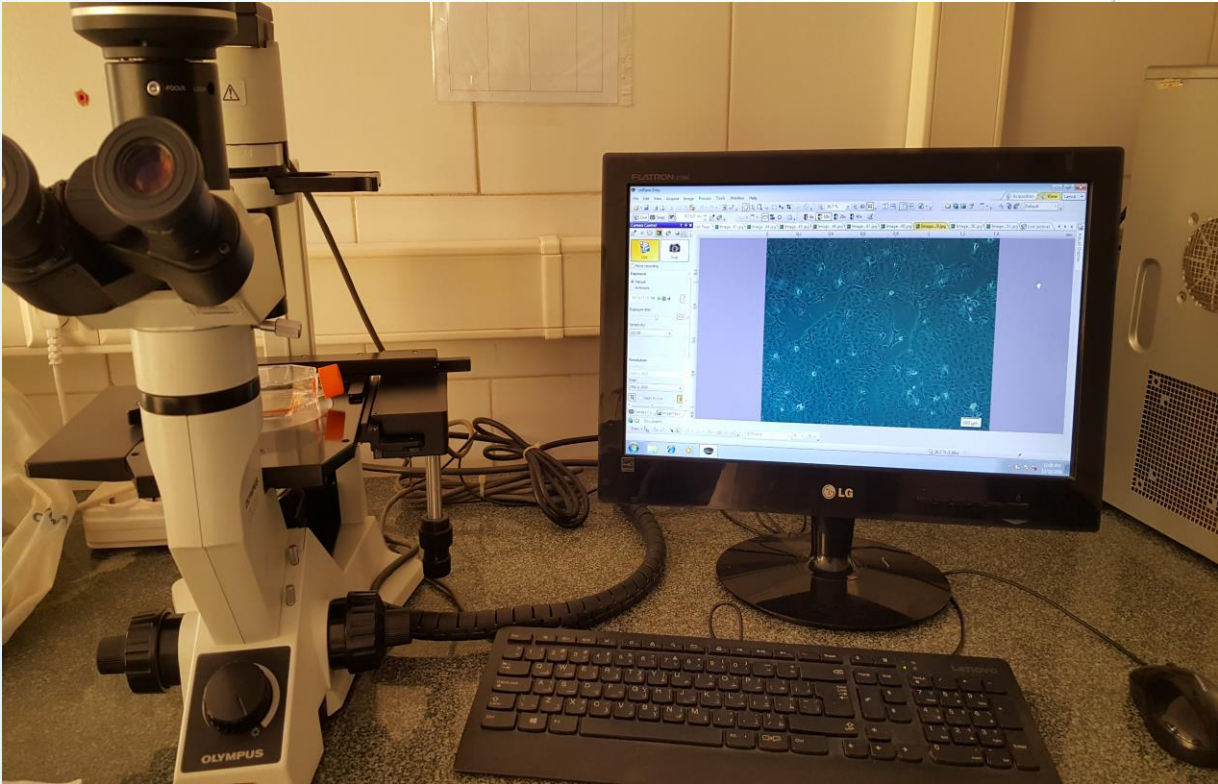
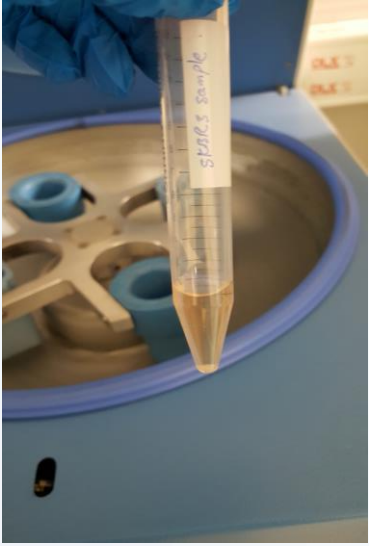




وبینار کشت سلول پستانداران (از صفر تا داده قابل اعتماد)

مدرس: دکتر الهه عمادی، استادیار پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کرمان

elahehemadi@yahoo.com



از سلول سالم تا داده قابل اعتماد

Authenticated Cell

Healthy Culture

Standardized Passage

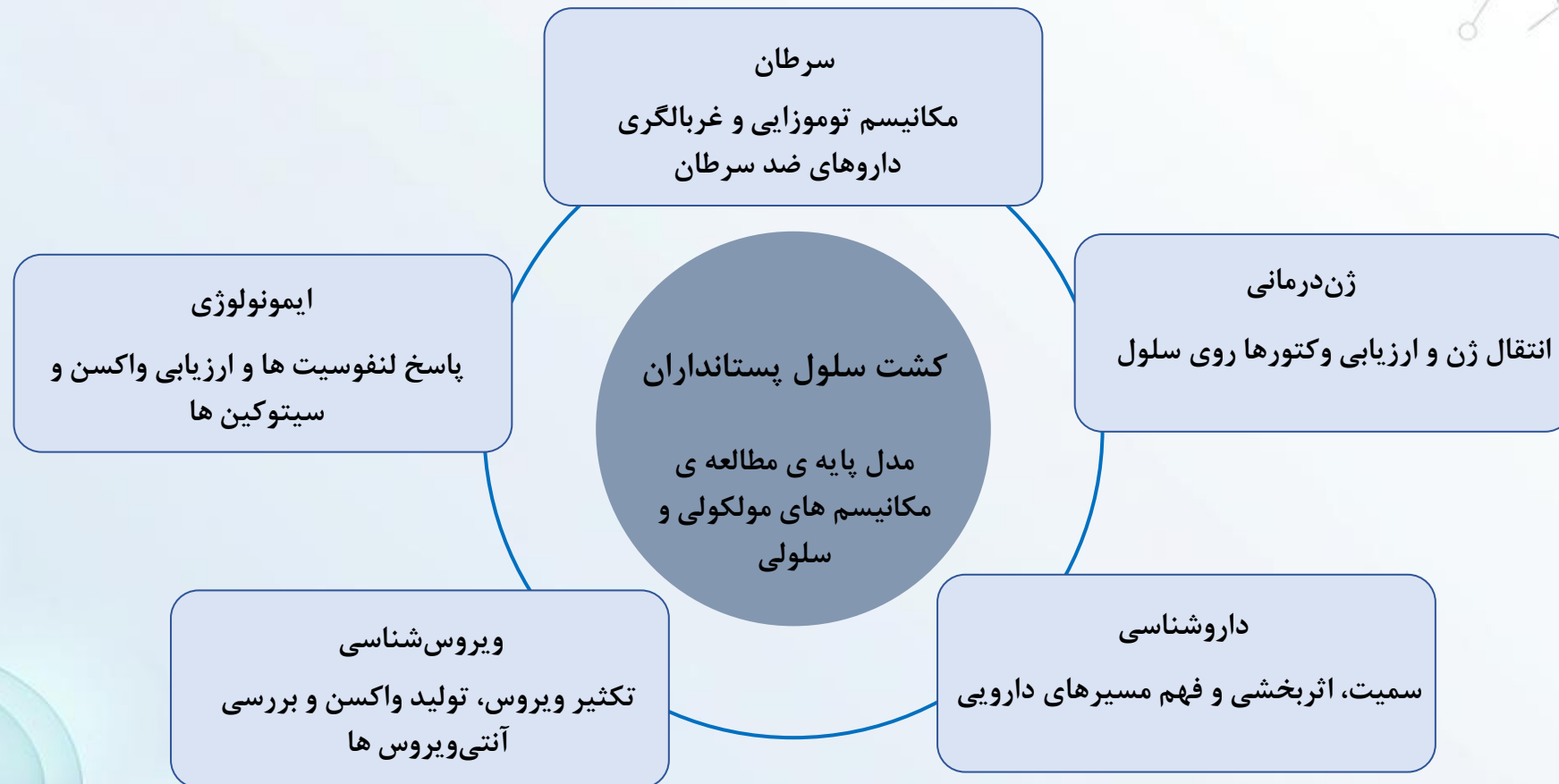
Controlled Seeding

Standardized Treatment

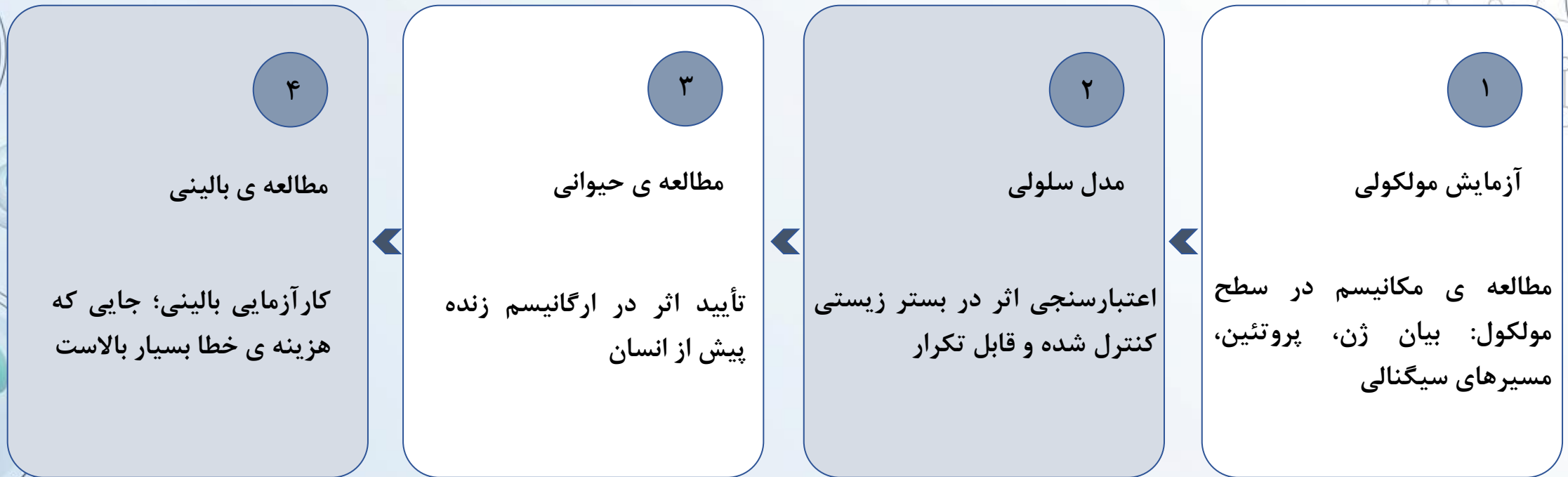
Validated Assay

Reliable Data

چرا کشت سلول مهم است؟



چرا کشت سلول مهم است؟



داده خوب و معتبر، فقط از **سلول سالم**، **استاندارد** و **شناسنامه دار** شروع می شود.

اصول طلایی کشت سلول

❖ هویت سلول را تأیید کنید.

❖ از بانک سلولی کار کنید، نه از کشت های قدیمی.

❖ سلول را در شرایط استاندارد و پایدار نگه دارید.

❖ همه مراحل را ثبت کنید.

❖ آلودگی را به طور فعال جست و جو کنید.

❖ آنتی بیوتیک جایگزین تکنیک آسپتیک نیست.



کشت سلول چیست؟ بازآفرینی زیستگاه درون تنی (In Vivo) در برون تنی (In Vitro)

❖ رشد و نگهداری سلول ها خارج از بدن در محیط کنترل شده

❖ نیازمند تأمین:

- مواد غذایی

- دما

- pH

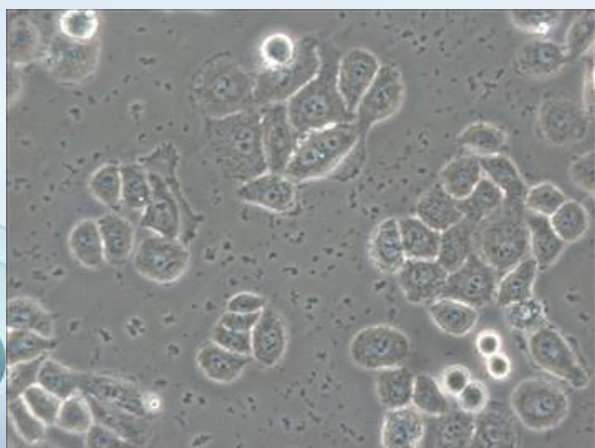
- گازهای مناسب

- رطوبت

- سطح اتصال یا ماتریکس

❖ هدف: حفظ بقا، رشد و تا حد امکان فنوتیپ مرتبط

❖ کشت سلول صرفاً یک پروتکل اجرایی نیست؛ متغیری تعیین کننده در طراحی علمی آزمایش است.



چرا سلول ها برای رشد به ۵ درصد CO₂ نیاز دارند؟

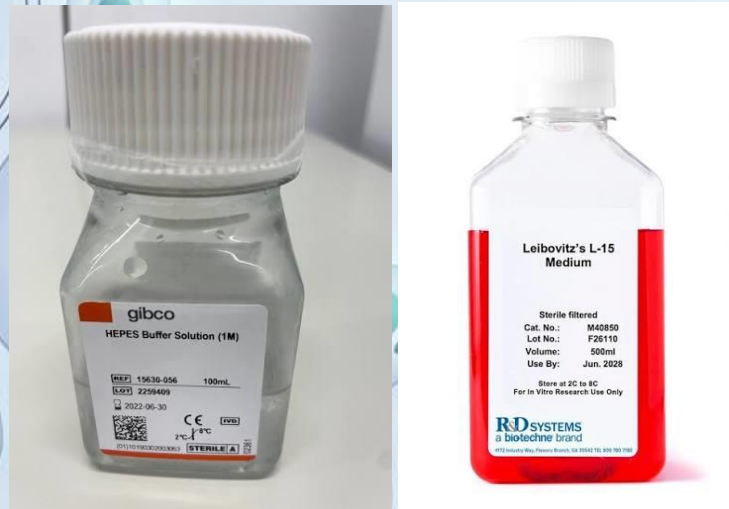
❖ برای تنظیم و تثبیت دقیق pH فیزیولوژیک محیط کشت (۷/۲-۷/۴)



❖ ۵ درصد CO₂ یک اهرم کنترلی خارجی برای حفظ تعادل اسید و باز است؛ نه یک ماده غذایی!

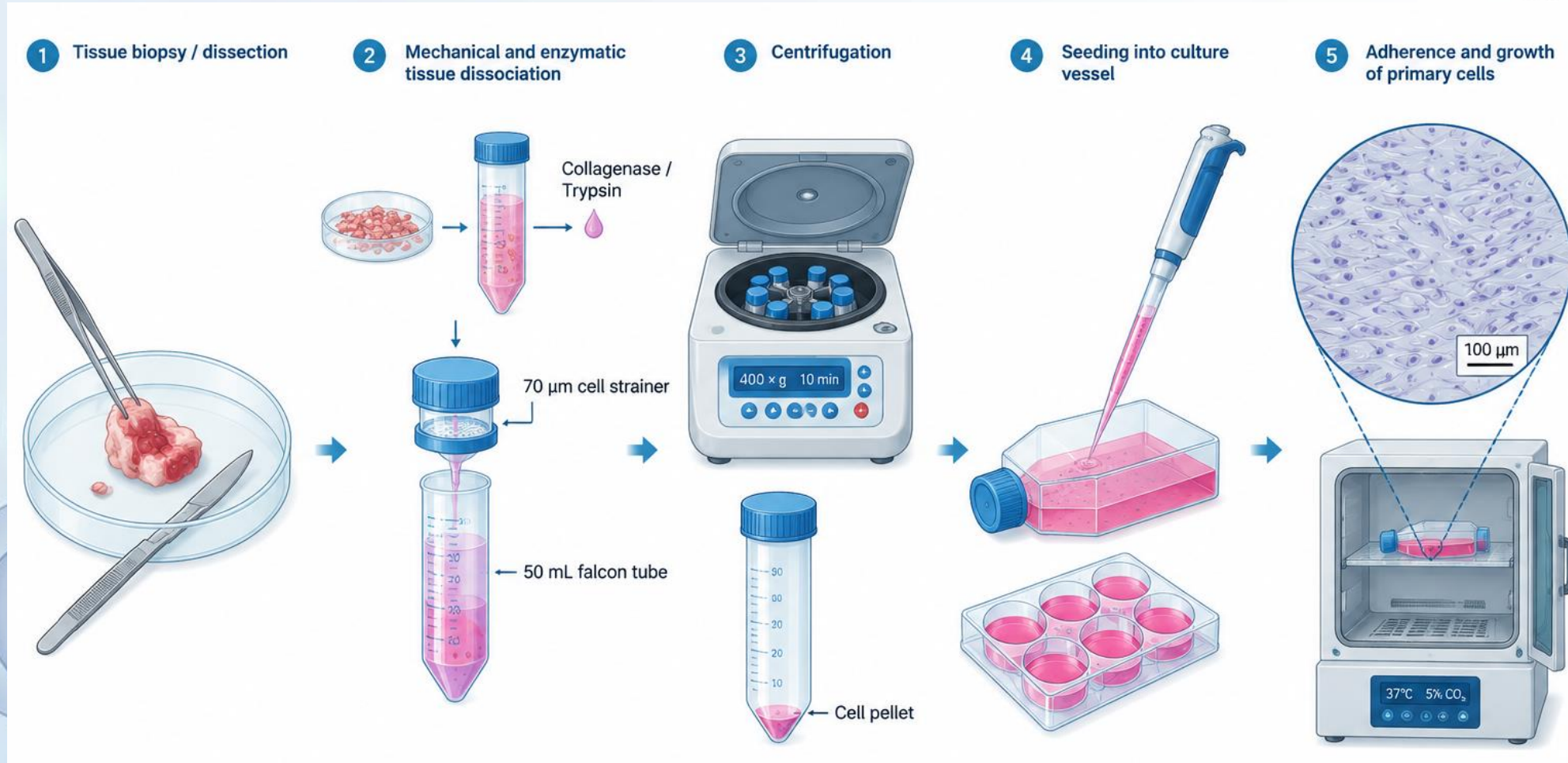
❖ جایگزین بدون نیاز به CO₂ چیست؟

- بافر آلی HEPES با غلظت ۱۰ تا ۲۵ میلی مولار
- محیط های کشت مستقل از CO₂ مثل Leibovitz's L-15



انواع سلول های مورد استفاده

نوع	ویژگی ها	مزیت	محدودیت
کشت اولیه	مستقیماً از بافت/نمونه انسانی یا حیوانی	شباهت بیشتر به بافت طبیعی	عمر محدود، تنوع زیاد، دشواری استانداردسازی

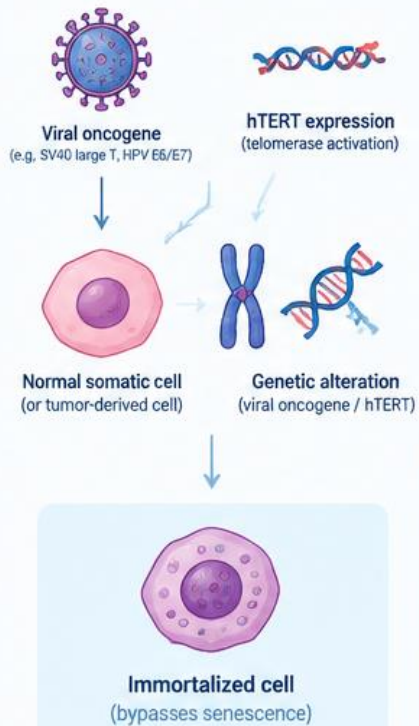


انواع سلول های مورد استفاده

نوع	ویژگی ها	مزیت	محدودیت
رده سلولی پیوسته	قابلیت تکثیر طولانی مدت	ساده تر، اقتصادی تر، تکرارپذیرتر	احتمال تغییرات ژنتیکی/فنوتیپی

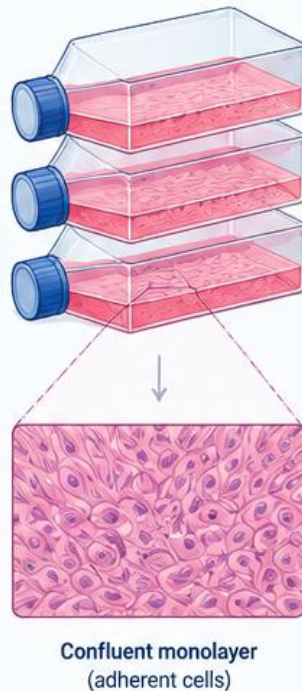
1 Transformation / Immortalization Origin

Cells acquire immortalizing properties via viral oncogene, hTERT expression, or tumor-derived source.



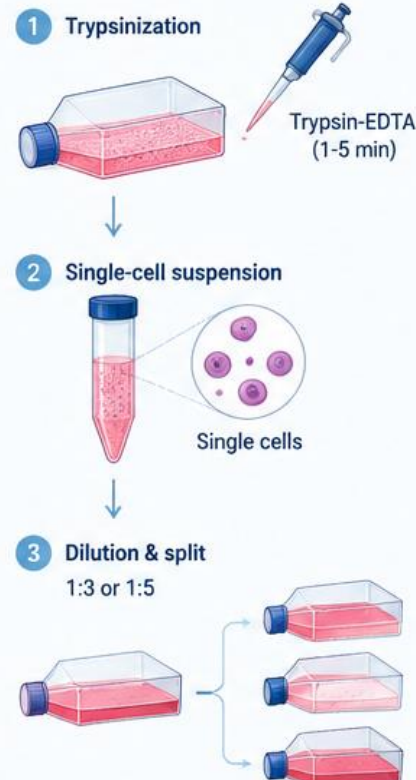
2 Continuous Monolayer Expansion

Cells are cultured in standard cell culture flasks with complete media, forming a confluent monolayer of adherent cells.



3 Routine Passaging / Subculturing

Cells are trypsinized, counted, then diluted and split (e.g., 1:3 or 1:5) into new flasks.



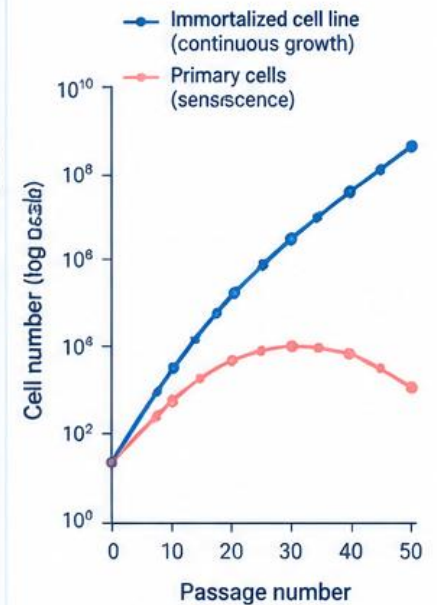
4 Cell Banking and Preservation

Cells are cryopreserved in liquid nitrogen for long-term storage. Master Cell Bank (MCB) and Working Cell Bank (WCB) are established.



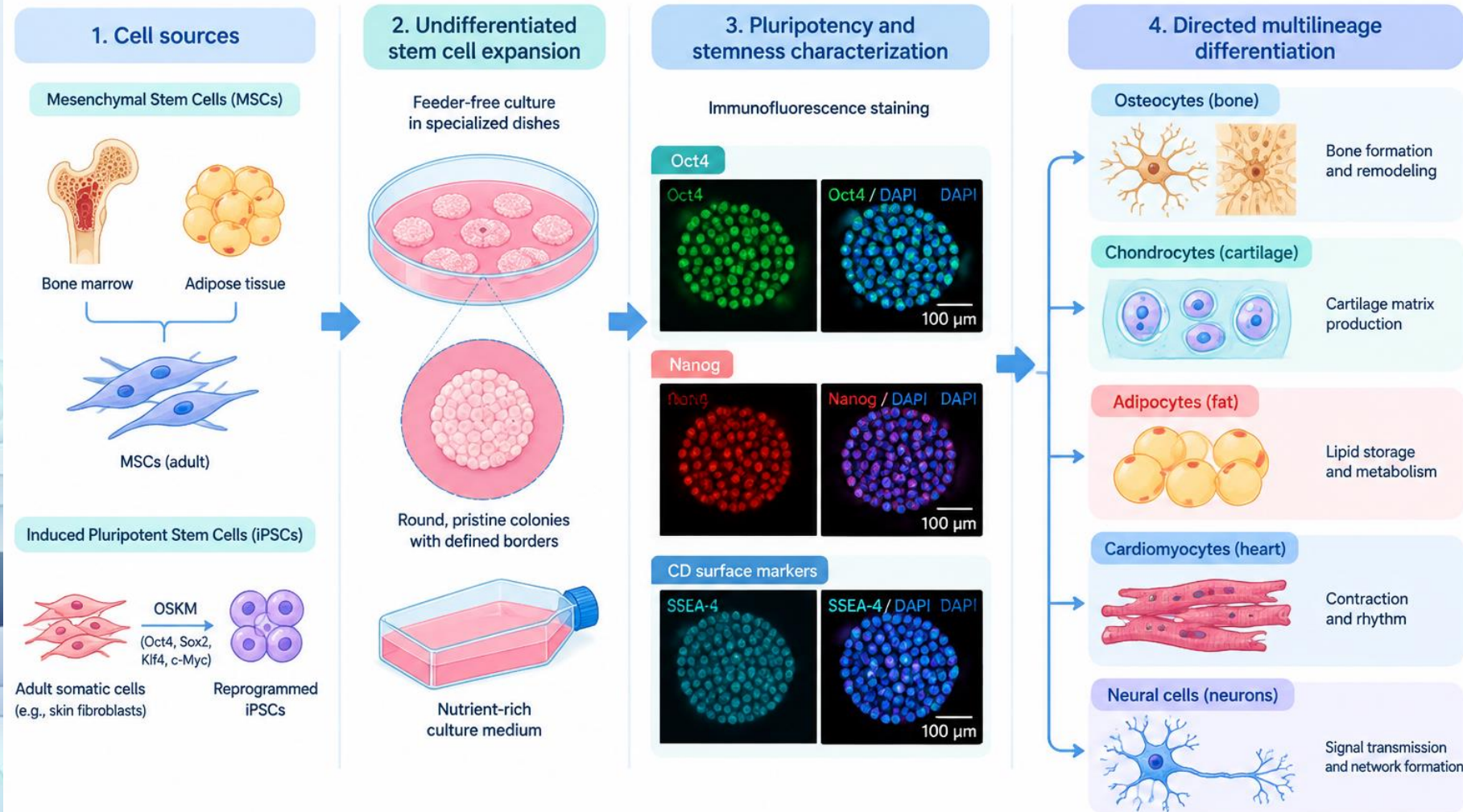
5 Continuous Growth Curve

Immortalized cell lines proliferate indefinitely, bypassing senescence and maintaining long-term growth in culture.



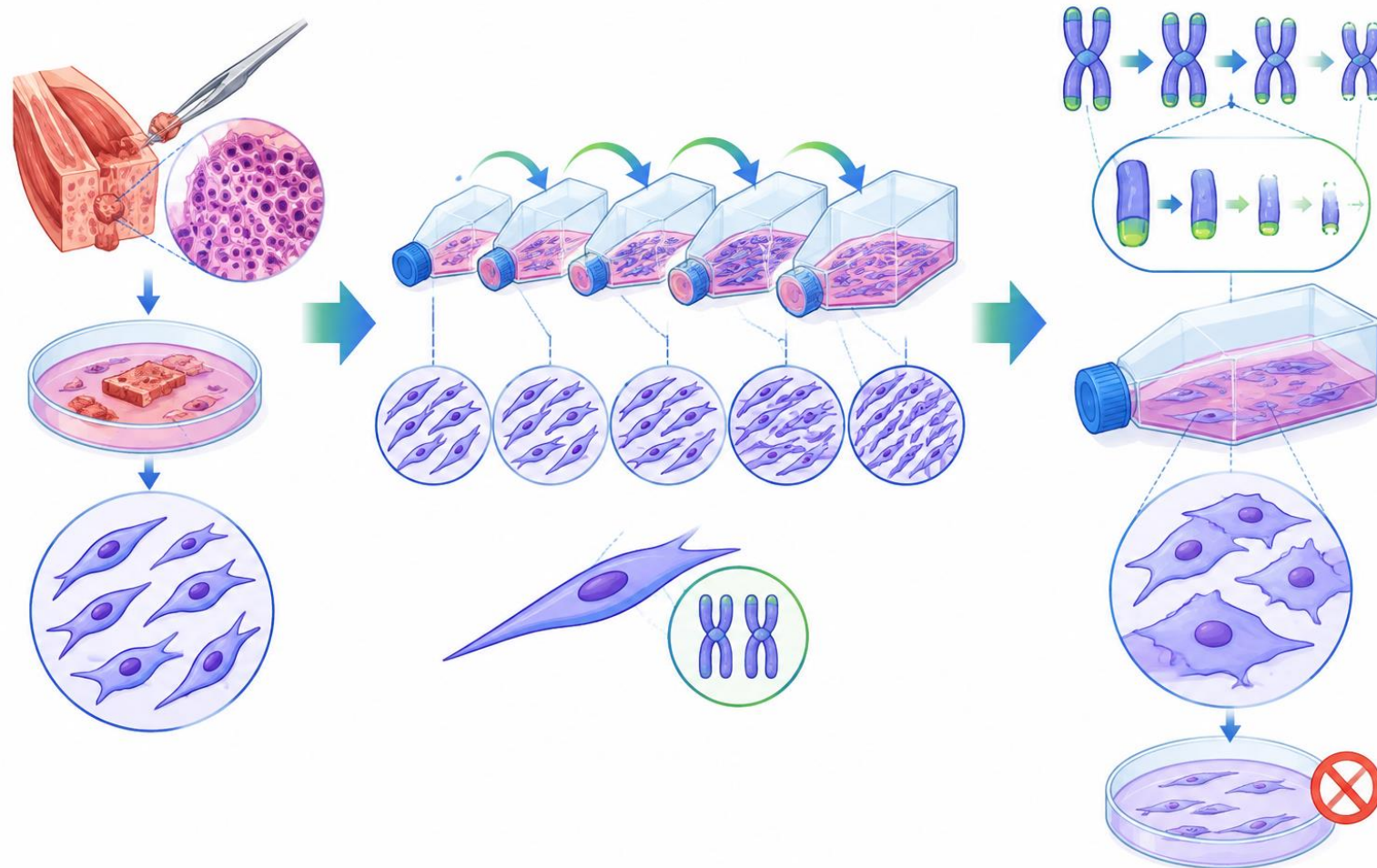
انواع سلول های مورد استفاده

نوع	ویژگی ها	مزیت	محدودیت
سلول های بنیادی	توان تمایز یا خودنوزایی	کاربرد گسترده در پزشکی بازساختی	حساسیت بالا و نیاز به کنترل کیفی دقیق



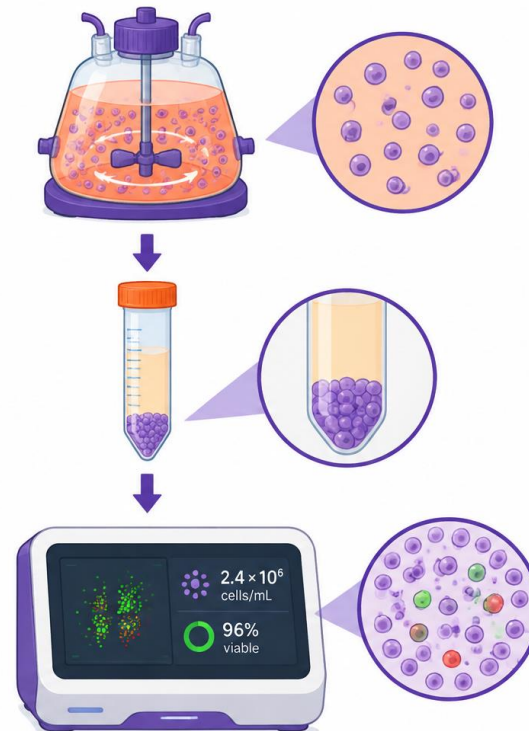
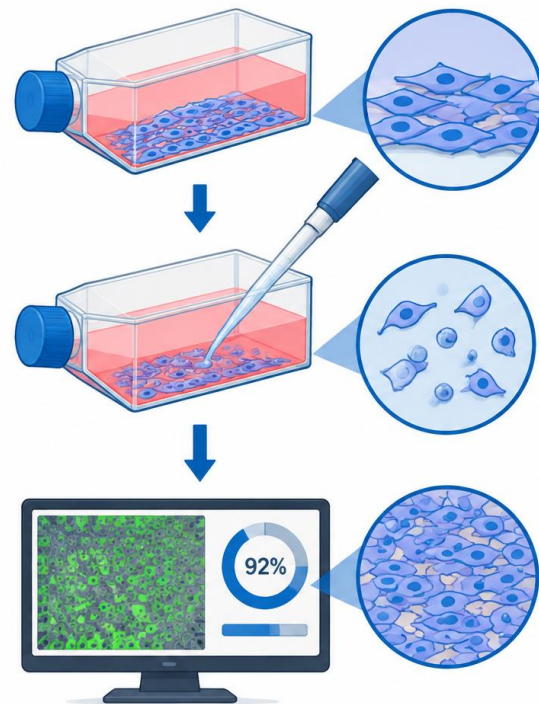
انواع سلول های مورد استفاده

نوع	ویژگی ها	مزیت	محدودیت
رده سلولی محدود	تعداد تقسیم محدود	مدل نزدیک تر به فیزیولوژی	نگهداری دشوارتر



چسبنده یا سوسپانسیونی؟

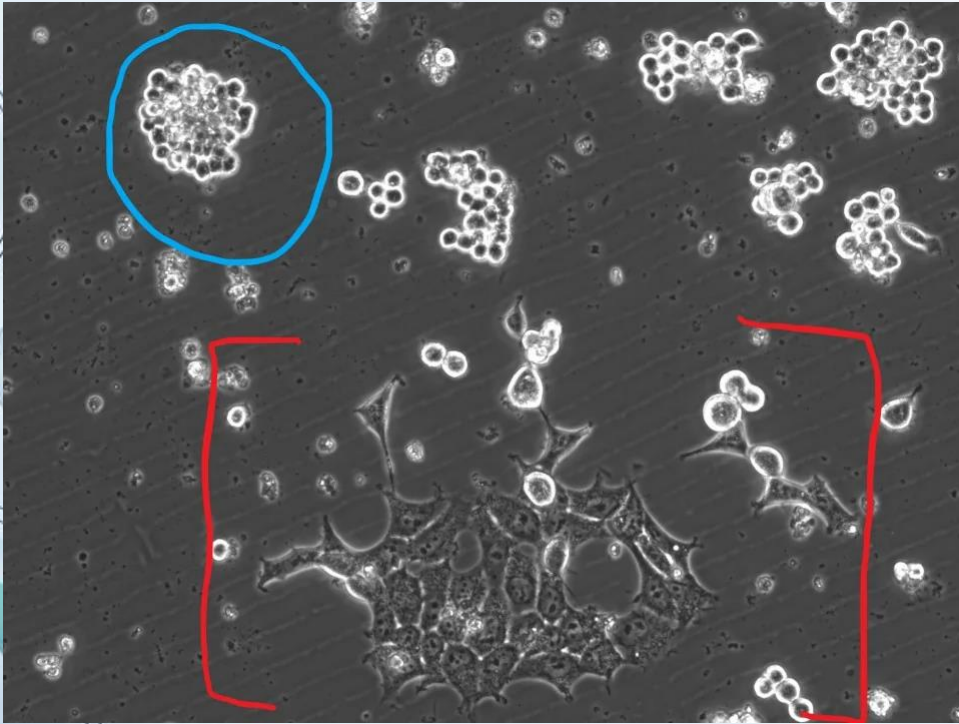
ویژگی	سلول سوسپانسیونی	سلول چسبنده
محل رشد	شناور در محیط	متصل به سطح فلاسک/پلیت
مثال کاربردی	بسیاری از رده‌های خونی و ایمنی	بسیاری از سلول‌های اپیتلیالی و فیبروبلاستی
زمان پاساژ	بر اساس تراکم سلولی	قبل از رسیدن به تراکم زیاد
جداسازی	معمولاً با رقیق سازی یا سانتریفیوژ	معمولاً با تریپسین یا روش آنزیمی
شاخص مهم	Viability و Cell density	Confluency



انتخاب رده سلولی: یک تصمیم پژوهشی

پیش از سفارش یا دریافت سلول، پاسخ دهید:

- ❖ سؤال اصلی پژوهش چیست؟
- ❖ گونه و منشأ بافتی مورد نیاز چیست؟
- ❖ آیا سلول دارای ویژگی مولکولی مورد نظر است؟
- ❖ آیا رده سلولی معتبر و قابل ردیابی است؟
- ❖ آیا روش شناسایی هویت سلول در دسترس است؟
- ❖ آیا امکان نگهداری، فریز و کنترل آلودگی وجود دارد؟
- ❖ Passage range قابل قبول برای پروژه چیست؟



مفهوم Cell Age و Passage Number

Passage = هر بار ساب کشت یا انتقال سلول به ظرف جدید

افزایش پاساژ ممکن است با تغییر در رشد، مورفولوژی، پاسخ دارویی، بیان ژن و پایداری ژنومی نیاز باشد.

در هر پروژه ثبت کنید:

❖ شماره پاساژ: Passage 6 (P6)

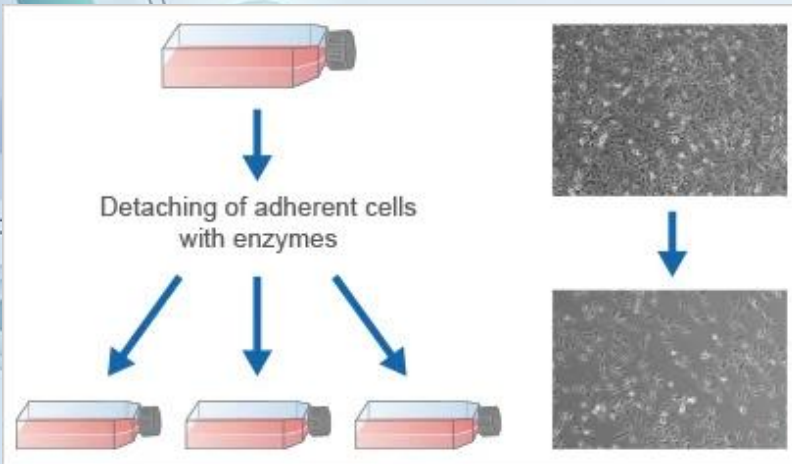
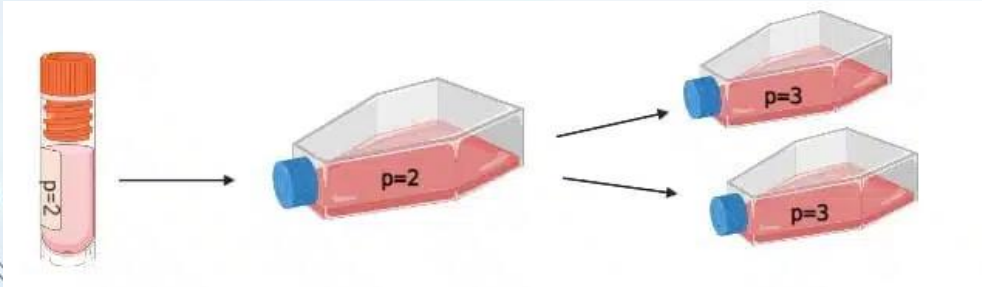
❖ تاریخ ذوب (Thaw Date): (Passage upon thawing: P+2) 1404/07/15

❖ تاریخ هر پاساژ

❖ منبع سلول: MCF-7 (ATCC HTB-22)

❖ محدوده پاساژ مجاز (Project Window): P3 to P12

❖ نسبت تقسیم (Split Ratio): ۱:۴ (تقریباً ۲ دو برابر شدن جمعیت)



اجزای محیط کشت



Basal medium:مانند DMEM، RPMI-1640، MEM، Ham's F-12

Serum: معمولاً FBS، منبع فاکتورهای رشد و پروتئین ها

L-glutamine یا جایگزین های پایدار

Penicillin/Streptomycin فقط در صورت نیاز و با احتیاط

Sodium bicarbonate و سیستم بافری

عوامل اختصاصی: EGF، انسولین، هورمون ها، فاکتور رشد، مکمل های تعریف شده



هموستاز فیزیکوشیمیایی: پایش pH، غلظت CO₂ و رنگ سنجی محیط کشت

❖ اکثر کشت های پستانداران: حدود ۳۷ C°

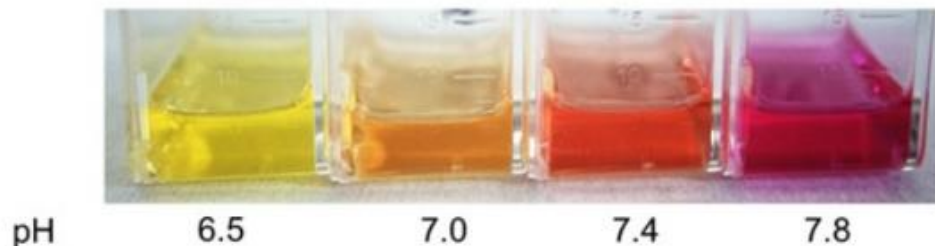
❖ فنول رد به عنوان شاخص تقریبی pH

• صورتی / قرمز: معمولاً مناسب یا کمی قلیایی

• زرد: اسیدی شدن، تراکم بالا یا آلودگی احتمالی

• بنفش: قلیایی شدن یا اختلال در CO₂

❖ رنگ محیط «تشخیص قطعی» نیست



Mammalian Cell Culture pH Monitoring

CO₂ Balance • Phenol Red Color Indication • Cell Health



Acidic
(pH < 6.8)

Optimal Physiological
(pH 7.2 - 7.4)

Alkaline
(pH > 7.6)



Overconfluent cells
(high cell density)



High lactate accumulation
(metabolic byproduct)



Bacterial contamination
(cloudy media / turbidity)



Closed non-vented cap
(limits CO₂ exchange)



5% CO₂ Incubator equilibrium
(stable pH environment)



Healthy adherent cells
(optimal morphology)



Balanced bicarbonate buffer
(maintains pH)



CO₂ depletion
(insufficient buffering)



Out of incubator
(no CO₂ atmosphere)



Loose cap
(reduced CO₂ retention)



Low cell density
(less acid production)



Right pH = Healthy Cells = Reliable Results

✓ Monitor pH • Maintain 5% CO₂ • Use Phenol Red
✓ Ensure Optimal Cell Growth & Viability



تجهيزات ضروری

❖ Biosafety Cabinet (Class II Type A2): حفاظت سه گانه (کاربر، نمونه، محیط زیست)



تجهيزات ضروری

❖ **Incubator CO₂** : تثبیت دما 37 ± 0.5 ، ۵ درصد گاز CO₂ و رطوبت اشباع (>۹۵٪).



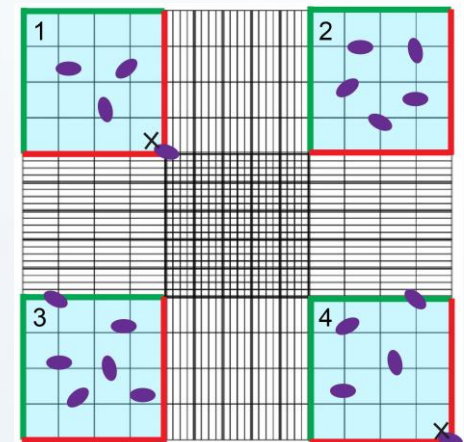
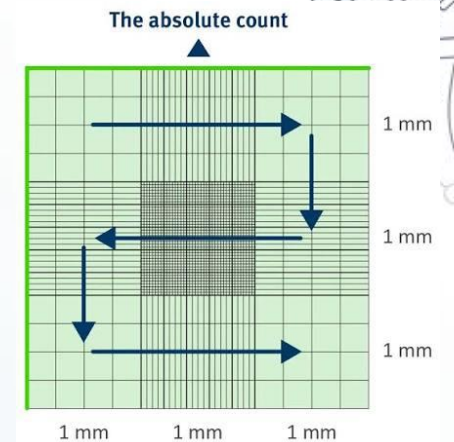
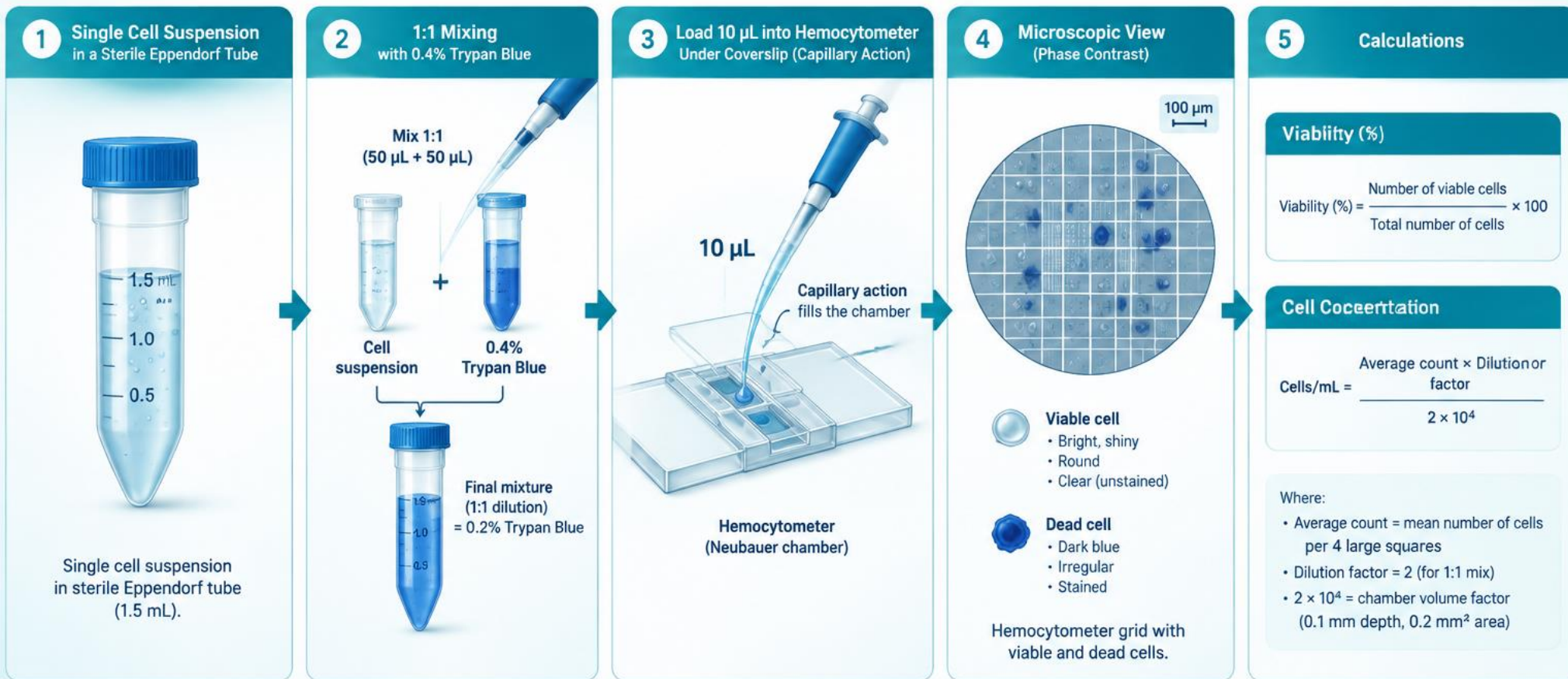
تجهيزات ضروری

❖ **Inverted Microscope (Phase Contrast)**: بررسی روزانه مرفولوژی، تراکم (Confluency) و سلامت سلول بدون باز کردن فلاسک



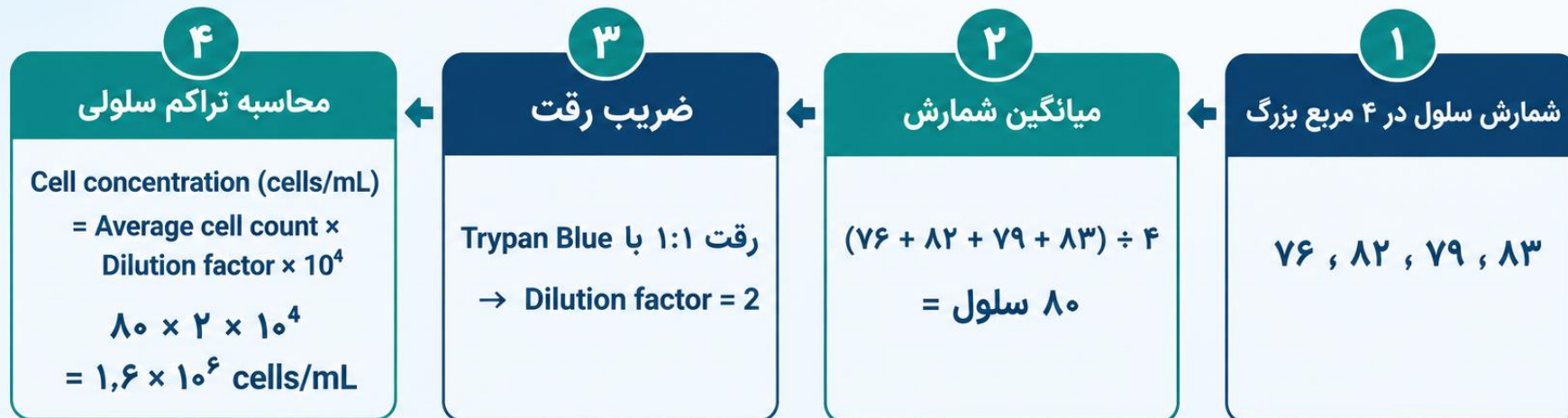
تجهيزات ضروری

❖ Cell Counter / Hemocytometer: سنجش تراکم و زنده مانی (Viability) با رنگ آمیزی تریپان بلو

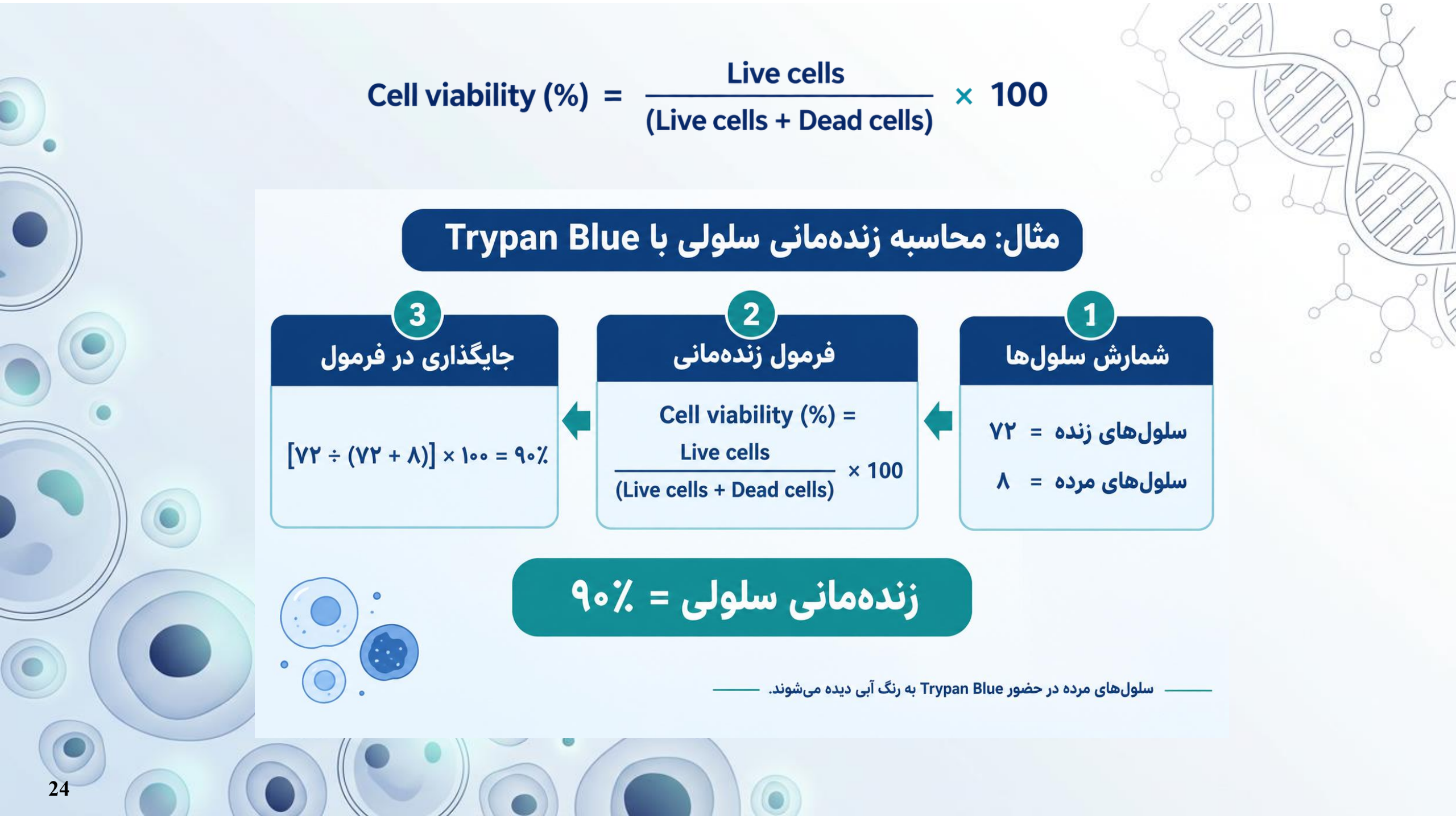


$$\text{Cell concentration (cells/mL)} = \text{Average cell count} \times \text{Dilution factor} \times 10^4$$

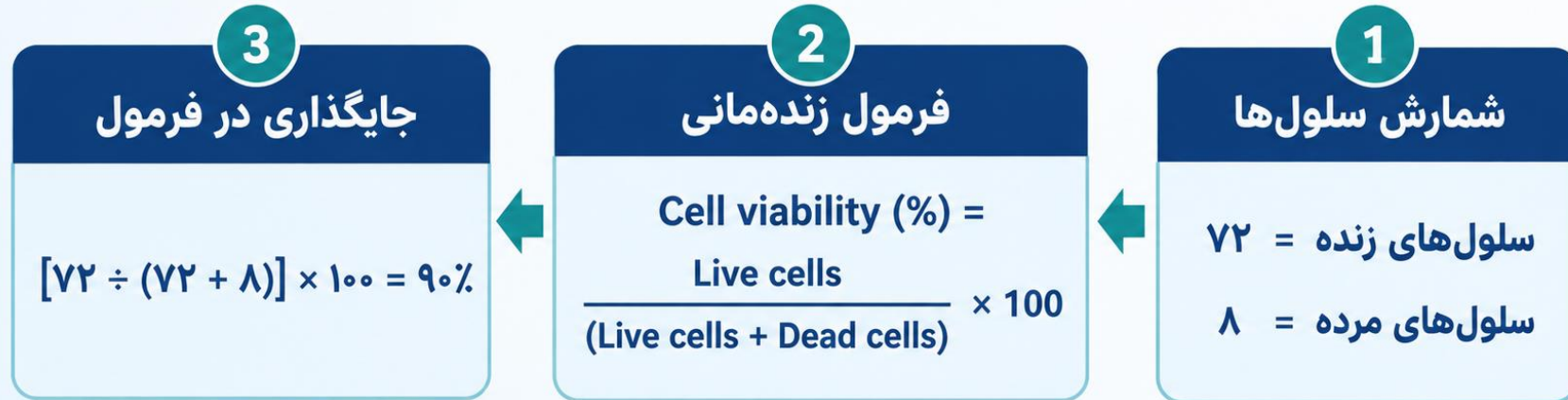
مثال: محاسبه تراکم سلولی با هموسایتومتر



تراکم سوسپانسیون سلولی = $1,6 \times 10^6$ سلول در هر میلی لیتر


$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{Live cells}}{(\text{Live cells} + \text{Dead cells})} \times 100$$

مثال: محاسبه زنده‌مانی سلولی با Trypan Blue



زنده‌مانی سلولی = ۹۰٪

سلول‌های مرده در حضور Trypan Blue به رنگ آبی دیده می‌شوند.

تجهيزات ضروری

❖ Temperature-Controlled Centrifuge ته نشینی سلول با شتاب بهینه $100-300 \times g$

$$RCF(g) = 1.118 \times 10^{-5} \times r \times (RPM)^2$$



تجهيزات ضروری

❖ Cold Chain & Biobanking ❖

- ❖ فریزر ۲۰- کوتاه مدت: آنتی بیوتیک، سرم و معرف ها
- ❖ فریزر ۸۰- میان مدت و خنک سازی تدریجی
- ❖ تانک نیتروژن مایع ($\leq -150^{\circ}\text{C}$) برای انجماد طولانی مدت



تجهیزات ضروری

❖ سمپلرهای اختصاصی کشت، سرسمپلرهای فیلتردار، فلاسک های TC-Treated و کرایوویال



ایمنی زیستی: قبل از شروع فکر کنید (Think Before You Act)

۱. منشأ و ماهیت نمونه (Source & Biology):

انسانی در برابر حیوانی

کشت اولیه با خطر پاتوژن های ناشناخته در مقابل رده های تجاری شناسنامه دار
دست کاری های ژنتیکی و وکتورهای ویروسی (Lentivirus, Retrovirus, AAV)

۲. ارزیابی نوع فعالیت (Activity & Procedure)

اقدامات با پتانسیل تولید آئروسول (سانتریفیوژ، پیتاژ شدید)

خطرات فیزیکی فرآیندها (انفجار کرایوویال هنگام ذوب از نیتروژن مایع)

۳. مهار و پاسخ به بحران (Containment & Response)

تجهیزات حفاظت فردی (PPE) متناسب با سطح خطر

بی خطر سازی و پسماند (اتوکلاو / هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ تازه)

پروتکل مدیریت فوری نشت (Spill Kit Protocol) و رعایت SOPها

Centrifuge Aerosol-Tight Biocontainment Safety Cups (Buckets)

Containment • Protection • Safer Labs



آماده سازی پیش از ورود به هود: انضباط کاری و حفظ پایداری جریان هوا

چک لیست طلایی پیش از باز کردن سش (Sash):

1. حفاظت فردی (PPE): روپوش اختصاصی با سرآستین کش دار + دستکش نیتریل تمیز
2. قانون اتانول ۷۰ درصد: ضدعفونی دستکش ها و جداره بیرونی تک تک اقلام پیش از ورود
3. برنامه ریزی متریال: بررسی انقضا، لیبل گذاری شفاف و چیدمان تمام مواد مورد نیاز از قبل
4. اصل خلوت سازی (Minimalism): خروج وسایل اضافی؛ جلوگیری از مسدود شدن گریل های هوا
5. سازمان دهی فضایی: تفکیک سخت گیرانه ناحیه تمیز از ناحیه پسماند/آلوده
6. پایش عملکرد: بررسی گیج فشار (مانومتر) و حداقل ۱۰ دقیقه کارکرد فن هود پیش از شروع



1 PPE Compliance

- ✓ Lab coat (fitted, knitted cuffed wrists)
- ✓ Nitrile gloves (comfortable fit, no tears)

2 70% Ethanol Rule

- ✓ Disinfect hands (gloved)
- ✓ Disinfect media bottles & surfaces before entry
- ✓ Use 70% ethanol (not higher)

3 Material Planning

- ✓ Pre-labeled sterile tubes
- ✓ Pipettes & tips (appropriate sizes)
- ✓ Check expiry dates (especially media, reagents, antibiotics)

4 Minimalism & Unblocked Grilles

- ✓ Keep interior decluttered
- ✓ Front & back perforated air grilles completely unblocked

5 Spatial Segregation (Clean to Dirty)

- ✓ Left: Clean Zone (sterile supplies)
- ✓ Center: Working Zone (cell culture work)
- ✓ Right: Biohazard Waste Zone (waste container)

6 System Monitoring

- ✓ Check airflow (typically 100–150 Pa)
- ✓ Ensure system is functioning normally
- ✓ Allow 10 minutes fan warm-up before use

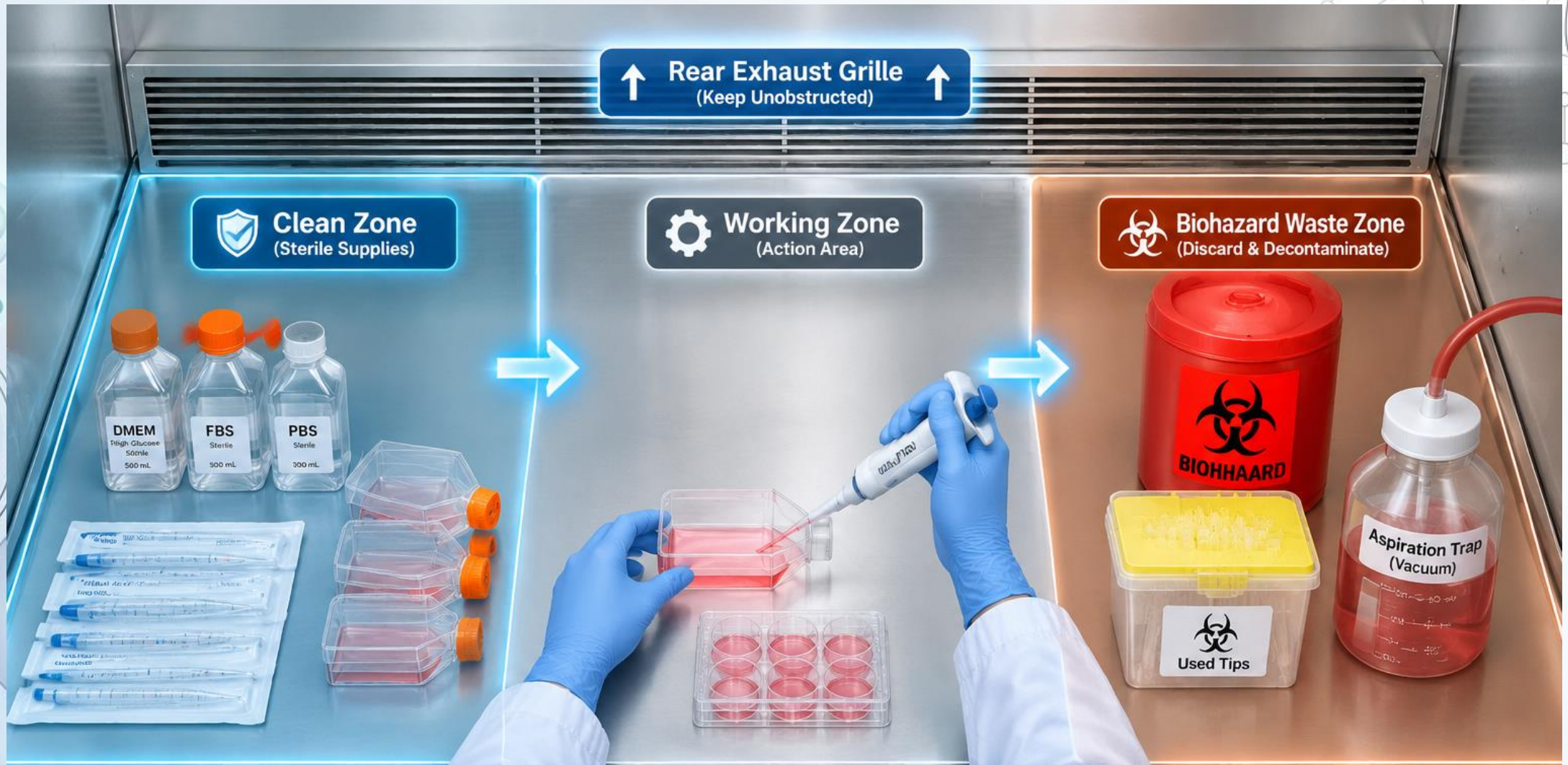
Class II Biological Safety Cabinet

Front Glass Sash

Airflow Gauge (Magnetic Manometer)

10-Minute Fan Warm-Up

چیدمان صحیح داخل هود



خطای رایج در تکنیک آسپتیک



10 Common Aseptic Technique Errors in Mammalian Cell Culture



Overcrowded Hood



Unsafe Contact



Speaking Over Open Plates



Reusing Pipette Tips



Caps Left Open



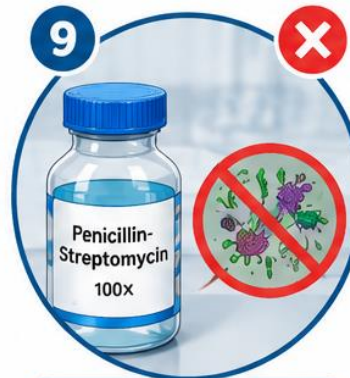
Rapid Turbulent Motions



Uncontrolled Sharing



Missing Labels



Antibiotic Crutch

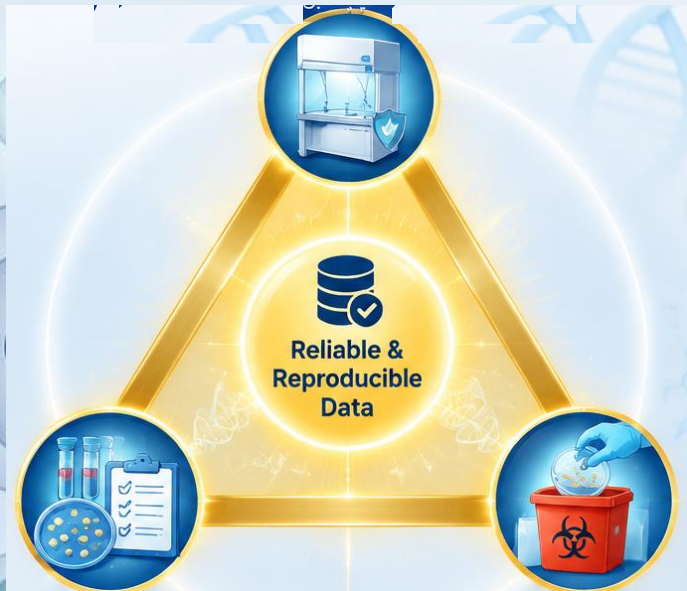


Cross-Cell Line Mixing

چرا آنتی بیوتیک راه حل اصلی نیست؟

1. نقاب آلودگی (Masking Effect)
 2. سستی سد حفاظتی (Narrow Spectrum)
 3. مغایرت با تکرارپذیری داده ها (Phenotypic Alteration)
 4. سردرگمی در ریشه یابی (Delayed Root-Cause Analysis)
- مثلت طلایی:

تکنیک آسپتیک بی نقص+پایش و قرنطینه دوره ای+شجاعت در دور ریختن کشت مشکوک

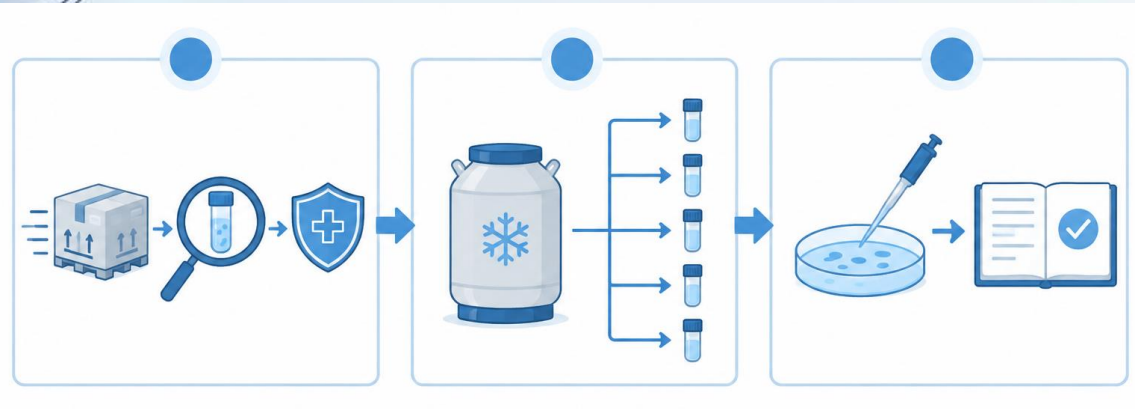


نقشه راه استاندارد کار با رده سلولی

فاز ۱: ورود و ارزیابی سلامت (Verification & Quarantine):

❖ تأمین معتبر و قرنطینه اولیه

❖ احراز کیفیت پایه



فاز ۲: استراتژی بانک گذاری دولایه (Tiered Cell Banking):

❖ ایجاد Master Cell Bank (MCB)

❖ تولید Working Cell Bank (WCB)

فاز ۳: عملیات و تضمین تکرارپذیری (Execution & GLP):

❖ پنجره طلایی پاساژ (Passage Limit)

❖ ثبت لاگ بوک جامع (Traceability)

استراتژی ذوب کرایویال (Thawing Protocol)

- ✓ پیش نیازها (Preparation): آماده سازی کامل محیط کشت (Pre-warmed at 37°C) + آماده سازی فلاسک با لیبل گذاری دقیق پیش از خروج ویال.
- ✓ قانون طلایی ذوب: ذوب سریع (Rapid Thaw) در بن ماری ۳۷ درجه تا آخرین تکه یخ، سپس انتقال آنی به محیط کشت.
- ✓ مدیریت DMSO: کاهش سمیت با رقیق سازی کنترل شده یا سانتریفیوژ (طبق پروتکل اختصاصی هر رده سلولی).
- ✓ کشت سلول: انتقال سوسپانسیون سلولی به فلاسک با تراکم (Seeding Density) استاندارد.
- ✓ رهگیری (Traceability): ثبت دقیق شماره ویال، Passage، تاریخ و کد اپراتور در لاگ بوک.
- ✓ پایش اولیه: ارزیابی مورفولوژی و اتصال (Adhesion) سلول ها در بازه ۱۸ تا ۲۴ ساعت.



پایش میکروسکوپی

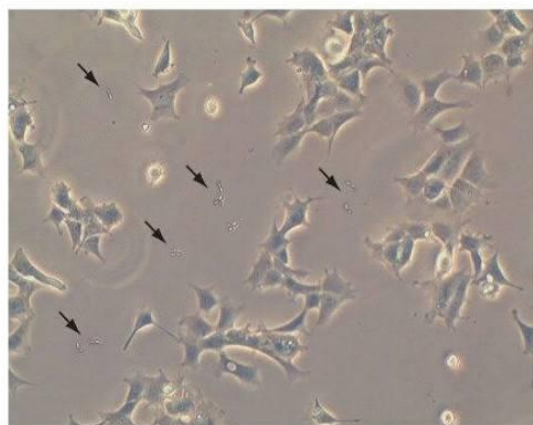
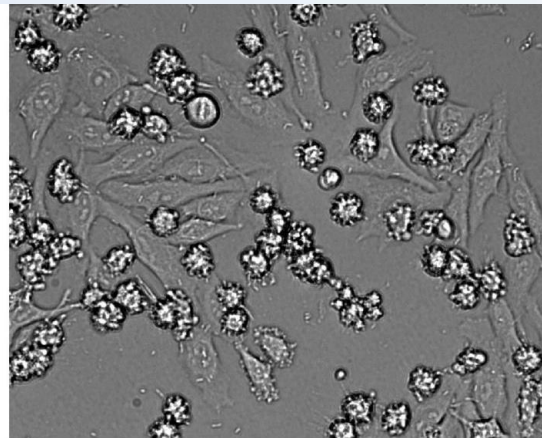
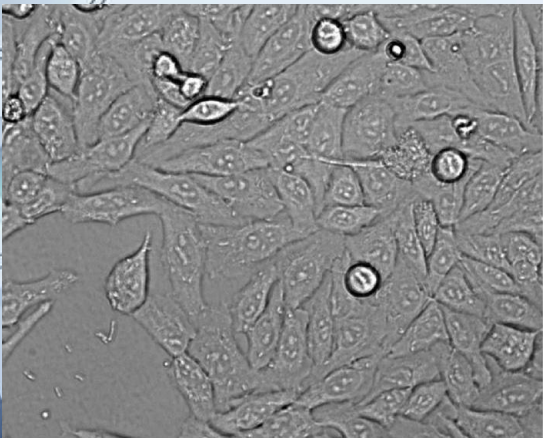
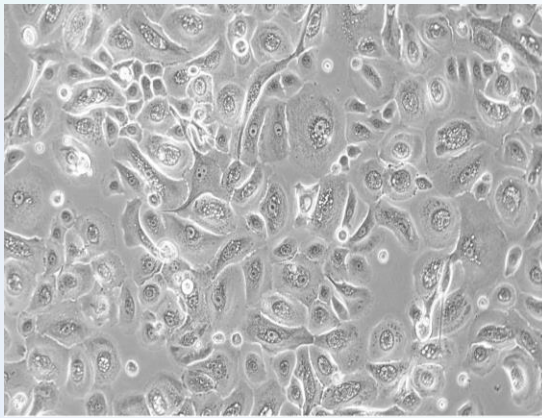
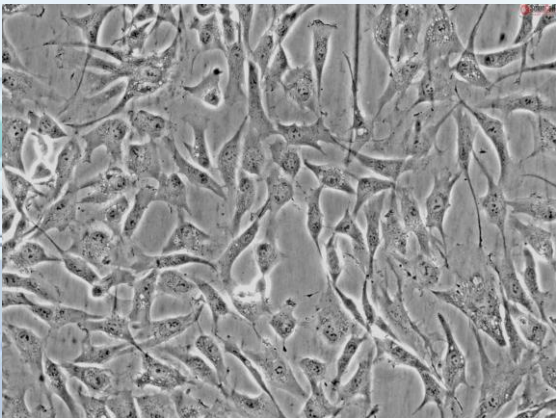
شاخص های سلامت سلولی (Green Flags / Homeostasis)

✓ وفاداری مورفولوژیک (Morphological Fidelity)

✓ اتصال پایدار و گسترش سطحی (Adhesion & Spreading)

✓ کینتیک رشد قابل پیش بینی (Predictable Kinetics)

✓ شفافیت پس زمینه (Background Clarity)



Cell culture contamination occurs when unwanted microorganisms enter a cell culture environment and proliferate alongside cultured cells.

Common contaminants include bacteria, fungi and yeasts.



پایش میکروسکوپی

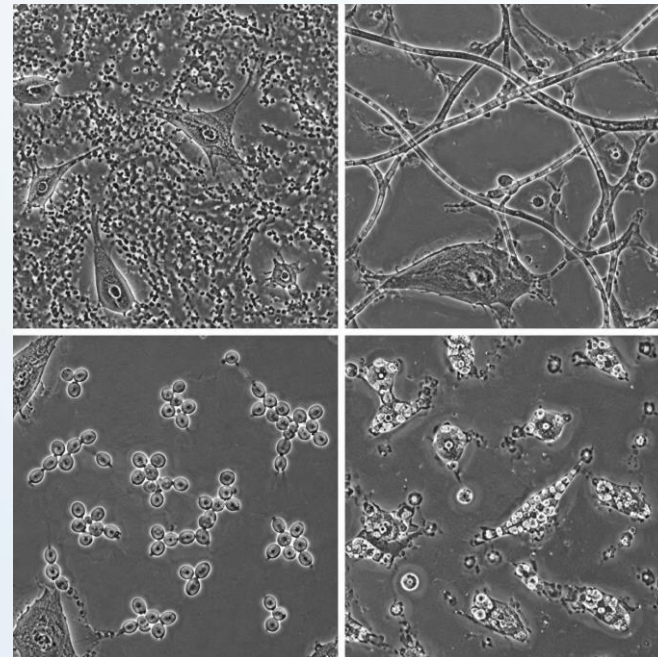
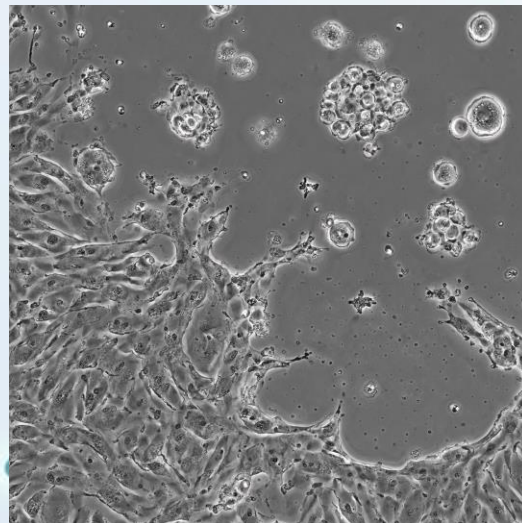
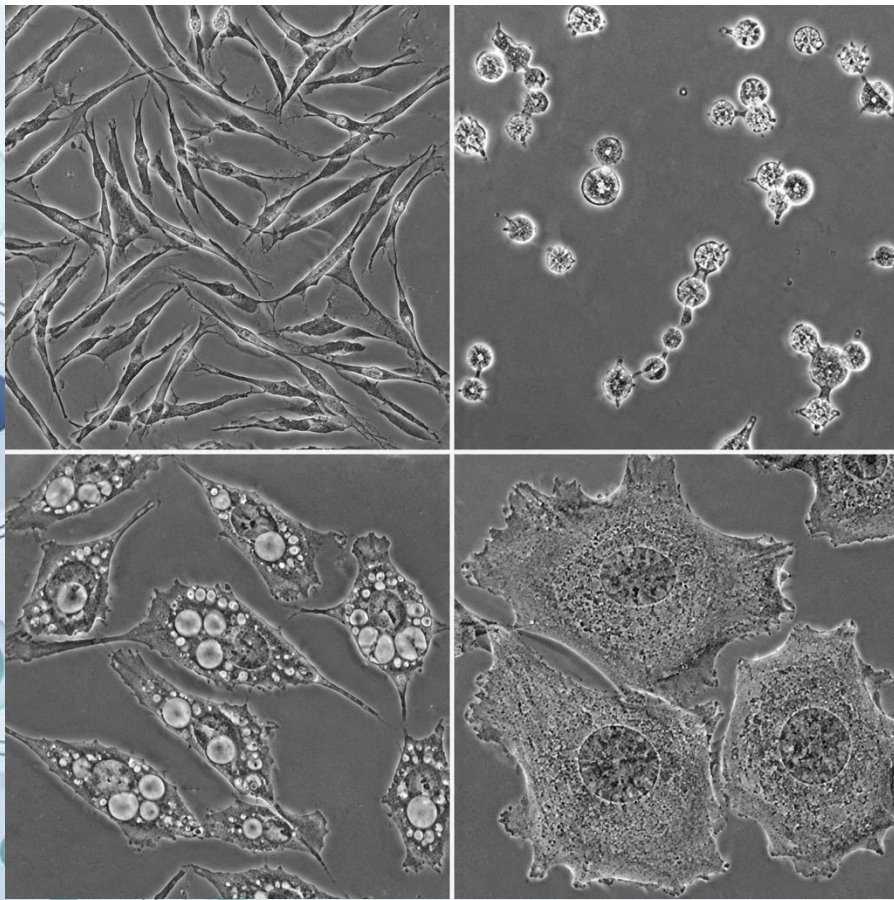
شاخص های خطر و هشدار زیستی (Red Flags / Cellular Stress)

تغییر فنوتیپی حاد (Phenotypic Drift)

جداشدگی توده ای (Detachment / Anoikis)

انحراف سینتیکی (Kinetic Deviation)

نشانه های زیستی آلودگی (Biological Intrusion)



هنر زمان بندی دقیق در کشت سلول

✓ تعریف **Confluency**: درصد پوشش سطح فلاسک توسط سلول های چسبنده (**Adherent Cells**).

✓ پنجره طلایی پاساژ (**Log Phase**):

- معمولاً در تراکم ۷۰٪ تا ۸۰٪ (پیش از ورود به فاز سکون/**Stationary**)

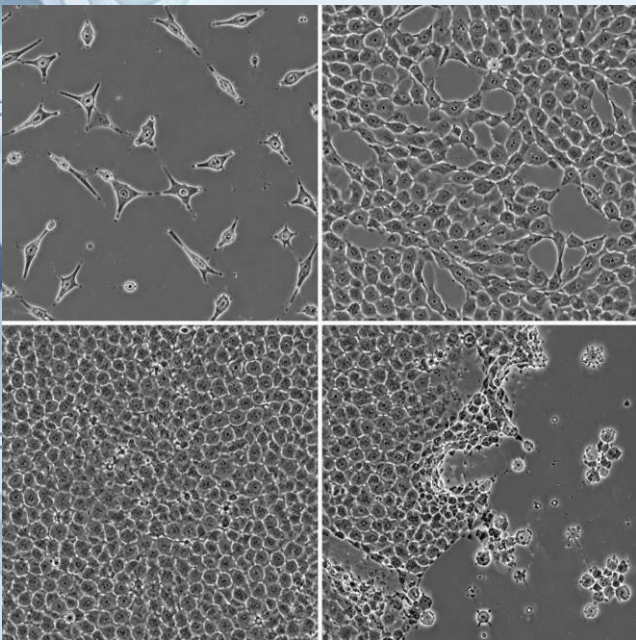
- ضرورت تطبیق با کاتالوگ مرجع (**ATCC**) و هدف آزمایش

✓ عواقب **Over-confluency** (تراکم بیش از حد):

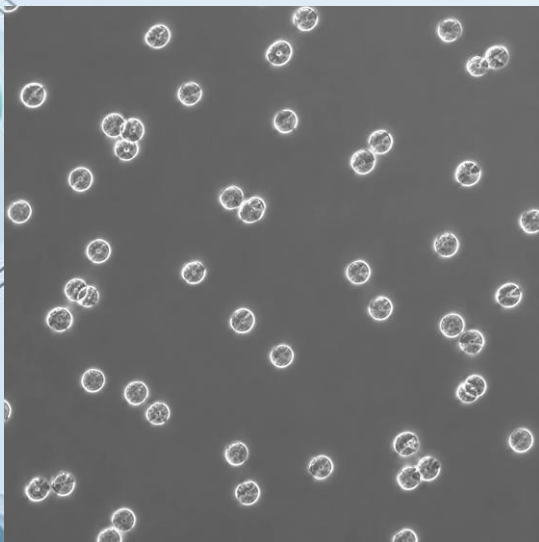
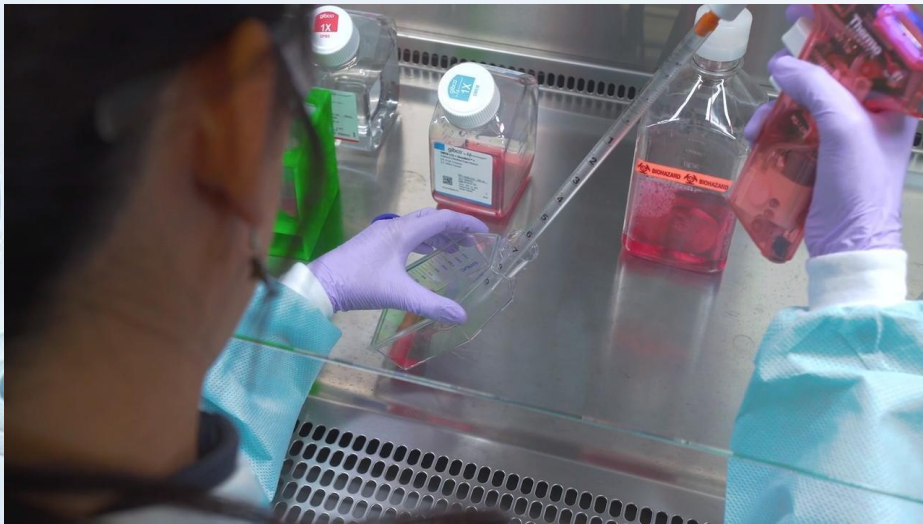
- تداخل های مکانیکی: مهار تماسی (**Contact Inhibition**) و جداسدگی خود به خودی

- تغییرات بیولوژیک: باز برنامه ریزی بیان ژن، انحراف فنوتیپی

- تنش محیطی: افت شدید pH، تجمع متابولیت های سمی و افزایش **Debris** سلولی



پاساژ سلول‌های چسبنده (Adherent Cell Passaging)



1. ارزیابی سلول ها: مورفولوژی، سلامت و Confluency

2. حذف محیط کشت

3. شست و شوی ملایم با PBS در صورت نیاز

4. افزودن محلول جداساز مناسب

5. پایش جدا شدن سلول ها و جلوگیری از تماس بیش از حد

6. خنثی سازی محلول جداساز با محیط مناسب

7. تهیه سوسپانسیون یکنواخت با پیتاژ ملایم

8. شمارش سلول و تعیین Split Ratio / Seeding Density

9. انتقال به ظرف کشت جدید ثبت

10. شرایط و جزئیات پاساژ

✓ نکته کلیدی: سلول ها را بر اساس رفتار واقعی شان پاساژ دهید، نه صرفاً بر اساس زمان.

پاساژ سلول‌های سوسپانسیونی (Suspension Cell Passaging)



1. بررسی Cell Density و Viability

2. مخلوط کردن ملایم برای یکنواخت سازی سوسپانسیون

3. رقیق سازی با محیط تازه یا در صورت نیاز: سانتریفیوژ و Resuspension

4. تنظیم تراکم اولیه برای کشت بعدی

5. انتقال به ظرف کشت و تنظیم حجم نهایی

6. ثبت اطلاعات پاساژ:

Cell Density

Viability

Passage Number

Final Volume

Culture Medium

اصل کلیدی: تراکم سلولی باید در محدوده مناسب هر رده حفظ شود.

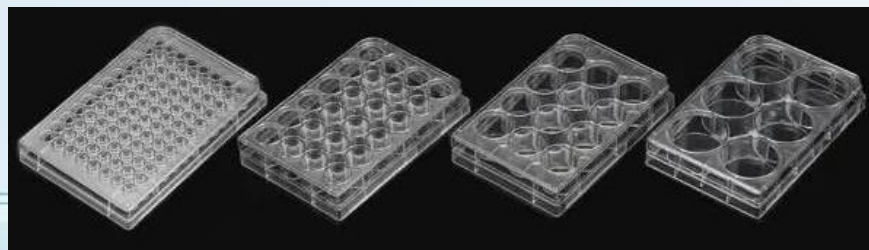
Seeding Density نقطه شروع داده های قابل مقایسه

یک Seeding Density مناسب باید:

- ✓ بین گروه‌های آزمایشی یکسان و استاندارد باشد.
- ✓ با مدت زمان آزمایش سازگار باشد.
- ✓ از **Over-confluence** در پایان آزمایش جلوگیری کند.
- ✓ متناسب با نوع آزمون و **Endpoint** انتخاب شود.

چه عواملی تعیین‌کننده‌اند؟

Treatment duration | Cell type | Plate format | Experimental intervention | Assay / Endpoint



وقتی آلودگی دیدیم، چه کنیم؟



اولین اصل: قرنطینه — مستند سازی — علت یابی

1. کشت مشکوک را قرنطینه کنید و از سایر کشت‌ها جدا نگه دارید.
 2. از بازکردن یا دست‌کاری غیر ضروری کشت خودداری کنید.
 3. مستندسازی: تصویر، Passage، Cell line، تاریخ، اپراتور و اتفاقات اخیر
 4. منابع مشترک را بررسی کنید: Hood، Incubator، Dissociation reagent، PBS، Serum، Medium
 5. کشت‌های مجاور و مرتبط را ارزیابی کنید.
 6. طبق SOP مرکز، کشت آلوده را غیرفعال و دفع کنید.
 7. محیط کار و تجهیزات مرتبط را پاک‌سازی و ضدعفونی و مسیر احتمالی آلودگی را بررسی کنید.
 8. پس از رفع مشکل، کار را با ویال سالم و تأیید شده از بانک سلولی از سر بگیرید.
- کشت مشکوک = داده مشکوک
- وقتی کیفیت داده مهم است، «نجات کشت» همیشه بهترین تصمیم نیست.

سناریوهای کاربردی

سناریوی ۱: زرد شدن زودهنگام محیط کشت (۲۴ ساعت پس از پاساژ)

الگوریتم اقدام (Action Protocol)

- ✓ ارزیابی میکروسکوپی
- ✓ کراس چک محیط و ظروف
- ✓ بررسی پارامترهای تجهیزات
- ✓ ترکیب مصرفی ها
- ✓ مدیریت ریسک

تشخیص افتراقی و علل احتمالی (Differential Diagnosis)

- ✓ متابولیسم و تراکم بالا
- ✓ نقص در شرایط فیزیوشیمیایی
- ✓ آلودگی میکروبی
- ✓ خطای آماده سازی/نگهداری
- ✓ تأخیر در فرآیند



سناریوهای کاربردی

سناریوی ۲: سلول ها رشد نمی کنند.

علل احتمالی

✓ آسیب ناشی از Thawing / Freezing

✓ نامناسب Seeding Density

✓ تماس بیش از حد با محلول جداساز

✓ محیط کشت یا Serum نامناسب

✓ اختلال در دما، CO₂ یا شرایط انکوباتور

✓ آلودگی پنهان؛ به ویژه Mycoplasma

✓ Passage بالا یا تغییرات فنوتیپی سلول

الگوریتم اقدام (Action Protocol)

✓ آیا سلول ها ظاهر طبیعی دارند (Morphology)؟

✓ آیا زنده مانگی کاهش یافته است (Viability)؟

✓ محیط، Serum و مواد مصرفی (Culture conditions)

✓ دما، CO₂ و عملکرد سیستم (Incubator)

✓ در صورت شک به آلودگی (Mycoplasma testing)

✓ مقایسه با کشت/ویال سالم و Passage پایین تر

سناریوهای کاربردی

سناریوی ۳: نتایج آزمون دارویی متناقض اند.

پرسش های کلیدی:

- ✓ آیا Passage بین آزمایش ها یکسان بوده است؟
- ✓ آیا seeding density استاندارد بوده است؟
- ✓ آیا confluency در آغاز درمان مشابه بوده است؟
- ✓ آیا سلول ها از نظر مایکوپلازما منفی بوده اند؟
- ✓ آیا lot سرم یا محیط تغییر کرده است؟
- ✓ آیا زمان تیمار و نحوه آماده سازی دارو یکسان بوده است؟
- ✓ آیا کنترل های مثبت و منفی وجود داشته اند؟

سپاس از توجه شما

پرسش و پاسخ

