

Testiranje gonadotropne aktivnosti hipofize šarana na žapcima

Danas se kod terapije s hormonalnim i ostalim biološkim preparatima doziranje vrši u jedinicama, tj. na osnovu njihove biološke aktivnosti. Naime, biološki preparati, pa i hormoni, testiraju se prije upotrebe na pogodnim pokusnim životinjama. Međutim, koliko nam je iz literature poznato, kod riba do sada nije učinjen ni jedan pokušaj testiranja ili standardizacije aktivnosti hormona, pa niti testiranje gonadotropne aktivnosti hipofize. Vlastita iskustva, podaci iz literature, kao i provedena mjerjenja težine hipofiza ukazale su nam, da aktivnost hipofiza šarana varira u vezi sa godišnjim dobom, sa spolom i starošću riba. Stoga bi kod stimulacije umjetnog mriještenja pomoću hipofiza bilo veoma pogodno, kada bi se umjesto dosadašnjeg doziranja, tj. aplikacije jedne ili nekoliko hipofiza moglo matice tretirati hipofizama, čija je gonadotropna aktivnost poznata.

Jedna od jednostavnih i opće priznatih metoda za utvrđivanje gonadotropnih hormona je Galli—Maininijeva reakcija. Pomoću nje se može dokazati prisutnost hormona folikulina i gonadotropina u urinu žena i u krvi kobila, pa služi za ranu dijagnostiku gravidnosti. Kod nas je tu reakciju i metode rada opisao I. Valpotić. Kao pokušne životinje služe žapci vrsta *Rana esculenta*, kojima se ispitivani materijal aplicira u dorzalnu limfnu vreću. Kod diagnostike gravidnosti se žapcima težine oko 30—40 g aplicira i ccm urina žene, odnosno seruma kobile. U pozitivnom slučaju, u urinu žapca se već nakon 30 minuta pojave spermiji, kao reakcija na aplicirane gonadotropne hormone. Kontrolu urina žapca je najbolje izvršiti oko 3 sata nakon aplikacije. Urin se žapcu izvadi iz kloake, pomoću posebno formirane staklene pipete. Iz pipete se kap urina stavlja na predmetnicu i pokrije pokrovnikom. Pod mikroskopom se malim povećanjem kap potraži na prisustvo spermija. Pregled urina žapca treba izvršiti i prije tretiranja.

Galli—Maininijevu reakciju odabrali smo za naš rad i zbog toga, što na ribnjacima postoji mogućnost lovljenja žabaca, pa su eksperimentalne životinje lako dostupne. Mužjaci se od ženki mogu razlikovati po vanjskim oznakama. Na IV prstu prednje noge, koji odgovara palcu, mužjaci imaju jastučasto zadebljanje, koje ženke nemaju. To zadebljanje je naročito pojačano za vrijeme parenja. Uz to, kod mužjaka iza kaudalnog luka usne šupljine, ispod slušne membrane, nalaze se obo-

strano kožni nabori, u kojem su smješteni zvučni mjehuri. Oni služe kao rezonatori zvuka. Karakteristika mužjaka je i to, što posjeduju refleks opasivanja sa prednjim nogama, što ženkama nije svojstveno.

Rad sa žapcima je mnogo brži i lakši, ako su svi ili barem većina prije stavljanja u pokus negativni, tj. da se u urinu ne nalaze spermiji. Zbog toga žapce treba smjestiti odvojeno od ženki, na tamno i hladno mjesto sa nešto vlage. Mi smo žapce nakon odvajanja držali najmanje 24 sata prije stavljanja u pokus u natkritim cementnim bazenima, smještenim u hladnoj i tamnoj prostoriji. Iako je u vrijeme rada još trajala sezona parenja, prije stavljanja u pokus ni jedan žabac nije u urinu imao spermije.

Važno je, da se kod izvođenja pokusa na žapcima aplikacija izvrši pravilno. Tehnika apliciranja je slijedeća: pomoćnik fiksira žapca, držeći ga desnom rukom za zadnje, a lijevom za prednje noge. Glavu i leđa životinje okreće prema onome tko vrši aplikaciju. Odmah iza glave probada se s injekcionom iglom koža, i to bez veće sile, jer u protivnom se lako može probasti i grudna šupljina, pa će tamo ući i aplicirana tekućina. Nakon tretiranja, žapce smo stavljali u staklene posude sa nešto vode na dnu. Temperatura prostorije u kojoj smo provodili pokuse kretala se je oko 20—22°C. Konstantna temperatura za vrijeme pokusa je od važnosti zbog toga, što žabe, kao poikilotermne životinje, reagiraju različito kod raznih temperatura okoline.

U literaturi nema podataka, da li žapci reagiraju na gonadotropne hormone riba. No, trebalo bi očekivati, da će hormoni te skupine životinja djelovati na žapce. Stoga smo u prvom pokusu željeli ustanoviti, da li aplikacija hipofize šarana izaziva kod žabaca reakciju, te da li je način reagiranja vremenski isti, kao i kod klasične Galli—Maininijeve reakcije. U tu svrhu smo u pokus stavili 3 skupine od po 2 žapca i aplicirali im različite količine acetonizirane hipofize ženki šarana, suspenzirane u 1 ccm fiziološke otopine. Žapci prve skupine primili su po 0,4 mg, žapci druge skupine 0,1 mg, a žapci treće skupine po 0,025 mg. Pregled urina žabaca izvršili smo nakon 45, 75, 105 i 180 minuta. Ustanovili smo, da su oba žapca prve i 1 žabac druge skupine reagirali na aplikaciju hipofize izbacivanjem spermije. Jedan žabac druge i oba žapca treće skupine bili su kod svih pregleda negativni. Pokazalo se je, da je reakcija

žabaca najintenzivnija oko 2—3 sata nakon aplikacije.

Pozitivni rezultat prvog pokusa otvorio nam je mogućnost, da pristupimo pokušaju kvantitativnog testiranja aktivnosti šaranskih hipofiza. Tražeći pogodnu metodu za testiranje, odlučili smo koristiti metodu W. R. Thompsona za utvrđivanje srednje efektivne doze, koju je usavršio i pojednostavio C. S. Weil. Weil-Thompsonova metoda je opće priznata i danas se veoma mnogo koristi u eksperimentalnoj farmakologiji i toksikologiji. Služi za utvrđivanje srednje efektivne doze (ED_{50}) i za utvrđivanje srednje letalne doze (LD_{50}) raznih supstanci.

Weil navodi, da se kod rada s ovom metodom i upotrebe tablica koje je on izradio da bi olakšao izračunavanje, treba pridržavati slijedećeg:

a) sa svakom dozom ispitivane tvari treba testirati isti broj životinja (2 ili 3 ili 4 itd. do 10). Ako to nije moguće, ne mogu se koristiti tablice, već se mora pristupiti komplikiranim preračunanjima;

b) visinu doza treba odrediti tako, da se one nalaze u geometrijskoj progresiji. Ako geometrijski faktor (R) iznosi 2,0, niz doza će izgledati na pr. ovako: 0,5, 1, 2 i 4 g. na 1 kg;

c) životinje treba tretirati sa najmanje 4 različite uzastopne doze iz niza sa određenim faktorom.

Na osnovu dobivenih rezultata, tj. broja životinja koje su kod pojedinih doza reagirale, u Weil-ovim tablicama se očitaju elementi potrebiti za uvrštanje u formule koje se koriste za izračunavanje, a osnovna formula glasi:

$$\log m = \log D_a + d(f+1)$$

gdje je

$$\begin{aligned} \log m &+ \log ED_{50} \text{ ili } \log LD_{50} \\ \log D_a &= \text{logaritam najniže od 4 upotrebljene doze.} \end{aligned}$$

$$d = \text{logaritam upotrebljenog geometr. faktora (R).}$$

$$f = \text{frakcija, koja se očita u Weil-ovim tablicama prema rezultatu pokusa.}$$

Za utvrđivanje granica pouzdanosti dobivenog rezultata, koje daju pouzdanost za ED_{50} od 100 slučajeva, upotrebljava se antilogaritam od logaritma $m \pm 2 \cdot 6 \log m$, gdje je:

$$6 \log m = d \cdot 6_f$$

Vrijednost 6_f očita se u Weil-ovim tablicama prema dobivenom rezultatu pokusa.

U drugom pokusu pristupili smo testiranju aktivnosti hipofiza, koje su 25. III izvadene spolno dozrelim šaranskim ženkama. Radi prikaza načina rada, opisat ćemo detaljnije pokus i izračunavanje.

U ovom, kao i u svim dalnjim pokusima, sa svakom dozom smo tretirali po 3 žapca,

na već opisani način. Prosječno težina žabaca u pokusima iznosila je oko 35 g. Visinu doza smo uvek određivali pomoću geometrijskog faktora 1,41, koji daje pouzdane rezultate. Naime, što je taj faktor manji, rezultati su tačniji. Određenu dozu uvek smo aplicirali kao suspenziju u 1 ccm fiziološke otopine.

Prije testiranja smo grupu osušenih hipofiza od šarana istog spola i težine, koje su bile izvedene istog dana, usitnili u prah u tarioniku i na taj način ih ujedno i dobro promiješali. Zatim smo na analitičkoj vagi odvagali potrebnu količinu hipofiza i pripremili suspenzije za testiranje na žapcima.

Žapce smo pregledali na prisustvo spermija u urinu prije tretiranja, te oko 90 i 150 minuta nakon tretiranja. Kao negativne ocijenili smo žapce kod kojih u tri pregledane kapi urina uopće nije bilo spermija, odnosno, kod kojih su nađeni samo mrtvi spermiji ili uz mrtve spermije manje od tri živa i pokretna. Kao pozitivne smo ocijenili one žapce, kod kojih je nađeno tri ili više pokretna spermija u tri pregledane kapi.

Da bi ubrzali dobivanje rezultata, žapcima smo aplicirali široki raspon doza, tako da smo u pokus stavili 10 skupina od po 3 životinje. Slično smo postupili i u ostalim pokusima. Doze i rezultati drugog pokusa izneseni su u tablici 1.

Tablica br. 1

Doza suhe hipofize u mg	0,05	0,07	0,1	0,14	0,2	0,28	0,4	0,56	0,025	0,035
Broj žabaca koji su reagirali pozitivno	0	0	1	1	1	1	3	3	0	0

Dobiveni rezultati su pokazali, da će se ED_{50} kretati između 0,1 i 0,4 mg. Na osnovu tablice smo ustanovili, izračunavanje ED_{50} može koristiti za rezultate dobivene na žapcima tretiranim sa dozama od 0,14, 0,2, 0,28 i 0,4 mg. Naime, za rezultat 1, 1, 1, 3 su u tablicama izneseni podaci za f i 6_f , koji iznose: $f = 0,75$ i $6_f = 0,71807$. Prema tome:

$$\begin{aligned} \log ED_{50} &= \log D_a + d \cdot (f+1) \\ &= \log 0,14 + \log 1,41 (0,75+1) \\ &= 0,14613 - 1 + 0,14644 \times 1,75 \\ &= 0,14613 - 1 + 0,25637 \\ &= 2 \cdot 0,40250 - 1 \end{aligned}$$

$$ED_{50} = 0,2526 \text{ mg}$$

Sada još treba izračunati granice pouzdanosti dobivenog rezultata, koje iznose $\log ED_{50} \pm 2 \cdot 6 \log m$, gdje je

$$\begin{aligned} 6 \log ED_{50} &= d \times 6_f \\ &= 0,14644 \times 0,71807 \\ &= 0,10515 \end{aligned}$$

Prema tome, granice pouzdanosti variraju od

$$\log ED_{50} - 2 \cdot 6 \log m \text{ do } \log ED_{50} + 2 \cdot 6 \log m$$

odnosno,

$$\begin{array}{rcl} 0,40250 - 1 & & 0,40250 - 1 \\ - 0,21030 & & + 0,21030 \\ \hline \text{od log } 0,19220 - 1 \text{ do log } & & 0,61280 - 1 \end{array}$$

Antilogaritmi ovih logaritama iznose 0,1577 i 0,41. Prema tome, za hipofize šarana ženki, izvađene 25. ožujka dobiveno je kod testiranja na žapcima prosječne težine 35 g, da ED₅₀ iznosi 0,2526 (0,1577—0,41) mg.

U slijedeća tri pokusa testirali smo na isti način aktivnost tri skupine hipofiza mužjaka šarana. Rezultati ovih testiranja izneseni su u tablici br. 2.

Tablica br. 2

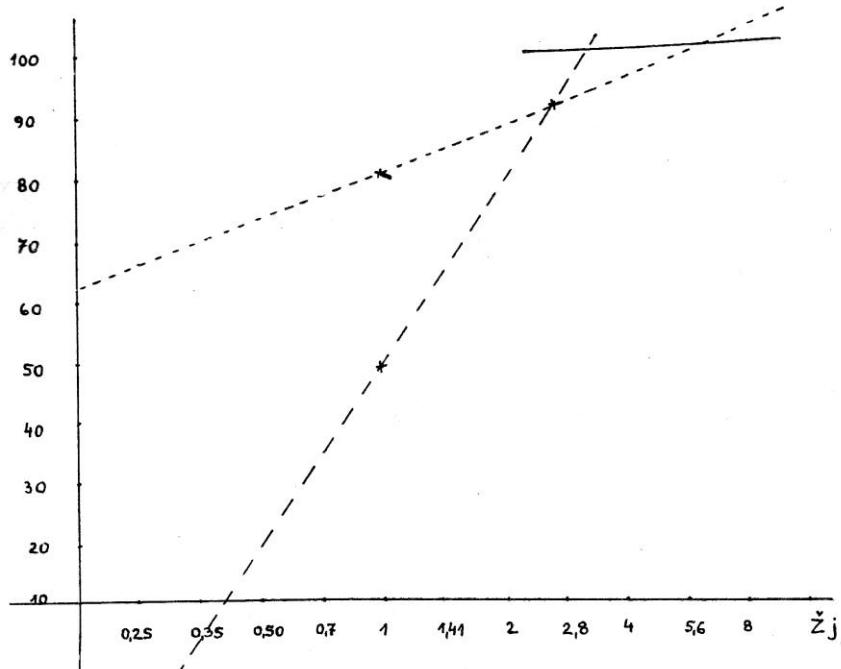
Pokus broj	datum uzim. hipofize	spol	ED ₅₀ na žap. izraž. u mg	Prosj. težina suhe hip. mg	težina šarana pros. količ. žabljih jed. (ŽJ) na 1 hip
2	25. III	ž	0,253 (0,158—0,41)	2,38	1,75 9,4
3	25. III	m	0,307 (0,188—0,503)	1,56	1,75 5,0
4	5. V	m	0,263 (0,15—0,461)	3,05	1,75 11,6
5	25. V	m	1,345 (0,434—4,078)	1,52	0,68 1,1

Iz tablice se vidi, da se 1 mg hipofize mužjaka i ženki uzete u rano proljeće po svojem gonadotropnom djelovanju mjenjom na žapcima malo razlikuje (muške hipofize su pokazale nešto slabiju aktivnost). Gonadotropna aktivnost 1 mg hipofiza mužjaka, koje su izvađene 5. svibnja, bila je nešto veća, nego kod hipofiza izvađenih 25. ožujka, i gotovo ista kao i kod hipofiza ženki od 25. ožujka. Međutim, kod hipofiza mužjaka, izvađenih 25. svibnja, je gonadotropna aktivnost 1 mg bila oko

5 puta manja, nego kod hipofiza izvađenih 5. svibnja. No, budući da su ove hipofize potjecale od malih, iako spolno zrelih šarana, ne može se reći, da li je njihova manja aktivnost bila uzrokovana sezonski ili manjim uzrastom.

Zanimalo nas je, kako se je kretala prosječna aktivnost jedne hipofize. Radi jednostavnosti preračunavanja, izražavanja i primjene u daljem radu, mi smo onu količinu hipofiza, koja predstavlja pedesetpostotnu efikasnu dozu nazvali žabljom jedinicom. Prema tome, 1 žablja jedinica (ŽJ) šaranske hipofize predstavlja onu količinu, izraženu u miligramima, koja kod 50% žabaca vrste Rana esculenta, težine oko 35 g, izaziva izbacivanje spermije. Na kraju tablice 1 su izneseni podaci, koliko ŽJ sadrži 1 hipofiza iz pojedinih testiranih skupina. Vidi se, da je aktivnost jedne prosječne hipofize mužjaka u razdoblju od 25. ožujka do 5. svibnja porasla za oko 2—3 puta, što predstavlja paralelan porast sa porastom prosječne težine. Rezultati pokusa 5 pokazuju, da su hipofize malih šarana mužjaka veoma slabo aktivne, iako su ti mužjaci na pritisak ispuštali mlijec sa pokretnim spermijem.

Dobiveni rezultati pokazuju, da kod hipofizacije šarana treba obratiti pažnju na kvalitetne hipofize, koje se upotrebljavaju. Doziranje, na osnovu broja hipofiza može biti nepouzданo zbog razlika u težini hipofiza, a doziranje određenom težinom hipofiza (u mg) može biti nesigurno zbog razlike u aktivnosti između težinski iste količine hipofiza.



U dalnjem radu, željeli smo na većem broju žabaca provjeriti tačnost dobivenih rezultata za ED_{50} i istovremeno ustanoviti, koliko žabljih jedinica bi trebalo aplicirati žapcima, da svi reagiraju sigurno pozitivno. Stoga smo postavili pokus 6 s četiri skupine od po 10 žabaca. Dvije skupine tretirali smo hipofizama mužjaka izvađenih 25. ožujka, a dvije skupine hipofizama ženki izvađenih koje su bile izvađene istog dana. Doze i rezultati izneseni su u tablici 3.

Tablica br. 3

Pokusna skupina	Porijeklo hipofize	količina ŽJ	hipofize mg	reakcija žabaca	
				pozitivno	negativno
I.	m. 25. III	1	0,3	5	5
II.	m. 25. III	2,8	0,84	9	1
III.	ž. 25. III	1	0,25	8	2
IV.	ž. 25. III	2,8	0,70	9	1

Pokus 6 je potvrdio vrijednost rezultata dobivenih pomoću Weil—Thompsonove metode. U skupini 1 je na dozu od 1 ED_{50} reagiralo tačno 50% žabaca, a u skupini 3, 80%. Što je još uvijek rezultat u granicama pouzdanosti ED_{50} . I u ovom pokusu, žapci su nešto bolje reagirali na istu količinu ŽJ hipofiza ženki, što ponovno ukazuje na njihovu nešto jaču gonadotropnu aktivnost.

Da bi približno ustanovili, koja najmanja količina hipofize može izazvati reakciju kod 100% žabaca, pripremili smo grafikon (vidi grafikon br. 1), iz koga se vidi, da bi se pozitivna reakcija kod 100% žabaca mogla očekivati pri dozama između 3 i 8 ŽJ, odnosno više.

U sljedećem pokusu smo željeli utvrditi, da li hipofize šarana djeluju i na žabe ženke. U tu svrhu smo postavili pokus 7, u kojem smo radili s dvije skupine od po 10 ženki. Skupina 1 tretirana je s 2,8 ŽJ hipofiza mužjaka (25. III), na 35 g težine. Svaka skupina je smještena u poseban stakleni akvarij. Dva sata nakon aplikacije, jedna žaba iz skupine 2 počela je izbacivati jaja. Do 12 sati nakon aplikacije nije bilo dalnjih pozitivnih reakcija. Između 12 i 24 sata je većina žaba u obje skupine izbacivala veću ili manju količinu jaja. Ovaj orientacioni pokus pokazuje, da hipofize šarana djeluju i na žabe ženke, ali efekat aplikacije se očituje mnogo kasnije nego kod žabaca. S obzirom na dozu, može se reći, da se približno istom količinom može postići gonadotropno djelovanje kod mužjaka i kod ženki. Kod doziranja u ŽJ nisu uočene razlike između djelovanja hipofiza šarana ženki i mužjaka.

Prije pokušaja primjene dobivenih rezultata na rad kod hipofizacije šarana razmotrili smo neke momente. Naime, zanimalo nas je, kakve bi doze bile potrebne za postizanje istog

djelovanja kod šarana, kad bi sasvim mehanički, tj. na osnovu razlika u težini eksperimentalnih životinja, izvršili preračunavanje. Budući da je za dobivanje pozitivne reakcije kod 50% žabaca pojedinačne težine 35 g potrebne 1 ŽJ, za postizavanje istog učinka kod šarana trebali bi na 1 kg težine matica aplicirati oko 28,8 ŽJ. To bi značilo, da bi ED_{50} za šarane, kod aplikacije hipofiza izvađenih ženkama 25. III teoretski iznosila oko 7,2 mg ili 3 hipofize na 1 kg tjelesne težine. Kod hipofiza izvađenih mužjacima 25. V ED_{50} bi iznosila 38,3 mg ili 25 hipofiza na 1 kg. Sigurno pozitivnu reakciju kod svih matica mogli bi, prema rezultatima pokusa na žapcima, teoretski postići dozom između 85,5 i 228 ŽJ na 1 kg težine šarana, odnosno s 9 do 24,2 hipofize ženki izvađene 25. III ili s 94 do 251 hipofize od mužjaka, koje su bile izvađene 25. V.

Da bi provjerili valjanost navedenih razmatranja, postavili smo pokus 8, u kojem smo hipofizama tretirali 4 skupine od po 5 matica (ženke). Maticе su težinski i po vanjskim znacima spolne dozrelosti bile ujednačene. Prosjek težine u svim skupinama iznosio je oko 2,65 kg. Porijeklo i doze hipofiza, te rezultat pokusa iznesen je u tablici 4.

Tablica br. 4

Skupina matica	Porijeklo hipofize	količina ŽJ	hipofize mg	Rezultat		
				na 1 kg kom	—	±
I.	ž. 25. III	30,5	7,74	3,3	1	2
II.	m. 25. III	30,3	9,30	4	3	2
III.	m. 25. III	7,7	2,36	1,5	5	0
IV.	m. 25. III	6,9	9,3	6,1	3	0

Kao što se vidi, pokus je postavljen tako, da se istovremeno dobiju slijedeći orijentacioni podaci: 1. da li teoretski, na osnovu rezultata kod žabaca izračunana količina ŽJ stvarno izaziva izbacivanje ikre kod predviđenog postotka šarana; 2. da li doziranje hipofiza u ŽJ daje pouzdano rezultate od doziranja u mg ili s određenim brojem hipofiza i 3. da li postoje razlike u djelovanju muških i ženskih hipofiza, ako se aplicira ista količina ŽJ.

Nakon tretiranja, maticе smo stavili u cementne bazene i promatrali kroz 72 sata. Rezultate smo očitali na slijedeći način: kao negativne (—) ocijenili smo maticе, kod kojih nije ustanovljeno ni najmanje ispuštanje ikre. Kao sumnjive (±) ocijenili smo one, kod kojih je makar jednom u toku 72 sata kod pritiska na trbušnu šupljinu izlazila manja količina (do 20 ccm) zrele ikre. Kao pozitivne (+) ocijenili smo maticе, koje su dale više od 20 ccm ikre.

Iz rezultata pokusa, iznesenih u tablici br. 4 se vidi, da se u skupini I. teoretski izračunana ED_{50} pokazala tačnom, jer je 40% ma-

tica reagiralo pozitivno, 40% sumnjivo, a samo 20% negativno. U skupini IV. je 4,1 puta manja doza od teoretski predviđene ED_{50} dala pozitivan rezultat kod 40% matica, što je na donjoj granici pouzdanosti teoretske ED_{50} . Međutim, u skupini II. niti jedna matica nije reagirala pozitivno na dozu koja bi teoretski trebala odgovarati ED_{50} .

Pokušaj da pomoći doziranju u žabljim jedinicama kod hipofizacije dobijemo sigurnije rezultate uspio je samo djelomično, i to u skupinama I. i IV., dok je rezultat u skupini II., da ni doziranje u žabljim jedinicama nije uviјek pouzdano.

Kod uspoređivanja rezultata dobivenih u skupinama I. i II. se također vidi, da hipofize mužjaka i ženki nisu imali jednak djelovanje. Naime, u ŽJ ista, a u mg i broju komada nešto veća doza muških hipofiza dala je slabije rezultate. Rezultat u skupini IV. dobiven težinski istom količinom muških hipofiza, koja je aplikirana i u skupini II. ukazuje nam na mogućnost, da su muške hipofize izvađene

25. V po svojem djelovanju na matice bile aktivnije od hipofiza mužjaka izvađenih 25. III.

Prema iznesenim podacima i dobivenim rezultatima možemo doći do zaključka, da bi i kod aplikacije hipofize trebali tačno poznavati njezinu biološku aktivnost, tj. trebali bi je prije upotrebe testirati, kao što se to čini kod drugih bioloških preparata. Mi smo utvrdili, da je moguće gonadotropnu aktivnost šaranske hipofize testirati na žapcima. Srednju efektivnu dozu (ED_{50}) izračunali smo na osnovi Weil-Thompsonovih tablica. Tu pedesetpostotnu efikasnu dozu nazvali smo jednom žabljom jedinicom (ŽJ). Naši pokusi nam pokazuju, da je i kod hipofizacije šarana moguće primijeniti princip doziranja hipofize u žabljim jedinicama, iako rezultati nisu uviјek bili stopostotni. Utvrđena činjenica, da je moguće testirati biološku vrijednost hipofize na žapcima stvara nove mogućnosti proučavanja problema hipofizacije, kao i mogućnosti tačnijeg provođenja hipofizacije kod šarana.

LITERATURA

1. Valpotić I.: Galli Maininijeva reakcija. Veterinar 10. 5—14 1960
2. Thompson W. R.: Use of Moving Averages and Interpolation to estimate Median-Effective Dose. Bact. Rev. 11, 115—145, 1947
3. Weil C. S.: Tables for Convenient Calculation of Median-Effective Dose (LD_{50} or ED_{50}) and Instructions in Their Use. Biometrics 8, 249-263, 1952. ribnjaka

»RIBARSTVO«

PODUZEĆE ZA PROMET SLATKOVODNOM I MORSKOM RIBOM
NA VELIKO I MALO
OSIJEK GORNJODRAVSKA OBALA 28, TELEFON 27-89 i 27-90

Snabdjeva domaće tržište putem svoje trgovinske mreže slatkvodnom i morskom ribom.

Vrši otkup puževa, žaba, i pijavica po najpovoljnijim tržnim cijenama.

INTERESENTI NEKA SE OBRATE NA GORNJI NASLOV

Poljoprivredno prehrambeni kombinat Orahovica Pogon Grudnjak

Telefon: Zdenci 3 Pošta Zdenci

Proizvodi konzumnog šarana, soma, smuda, linjaka kao i prvorazredni šarski mlad

Svoje proizvode prodaje na domaćem i inozemnom tržištu,
uz povoljne cijene, sa vlastitim transportnim sredstvima,
specijalnim vagonima kamionima