

ΒΙΟΛΟΓΙΑ.— **Das Hämoglobin des Lungenfischen *Protopterus aethiopicus*, I Die elektrophoretische Trennung in seinen Komponenten**, von *Anast. A. Christomanos und Friedrich Reinhard**. Ἀνεκοινώθη ὑπὸ τοῦ Ἀκαδημαϊκοῦ κ. Ν. Λούρου.

Der *Protopterus aethiopicus* gehört zur Unterklasse der *Dipnoidea* oder Lungenfische. Diese Unterklasse mit den zwei weiteren Unterklassen, die der *Actinopterygii* (Strahlenflosser) und die der *Crossopterygii* (Quastenflosser) bilden die Klasse der *Osteichthyes* (Knochenfische), welche wahrscheinlich aus einen unbekanntem Wirbeltierstamm vor ca. 440 Mil. Jahren im Silur zuerst erschien.

Zur heutigen Zeit ist die Mehrzahl der Vertreter der Lungenfische und der Quastenflosser aussgestorben. Beide dieser Gattungen umfassen heute nur noch wenige Arten, während die *Actinopterygii* fünfzig Ordnungen und viele tausend Gattungen umfassen. Sowohl die Lungenfische als auch die Quastenflosser waren in der Dewon'schen Periode durch zahlreiche Arten vertreten.

Als Urahne der heutigen Lungenfische gilt wahrscheinlich der *Dipterus* und als dessen Nachkommen im Paläozoikum, die *Scaumacia*, das *Phaneropleuron* und der *Uronemus* zu betrachten sind. Vom *Uronemus* leiten sich, ohne uns bekannten Zwischenstufen, die heute lebenden drei Arten von Lungenfischen, die sich durch morphologisch - anatomische Merkmale von einander unterscheiden lassen, (Fig. 1).

Diese drei Arten von Lungenfischen leben auf drei verschiedenen Kontinenten, indem sie zwar einen gemeinsamen Ursprung besaßen, aber später durch die Trennung der Kontinente, getrennt evoluierten. Obwohl alle drei Arten in grossen Linien die gleiche äussere Form besitzen, so ist der Afrikanische Lungenfisch *Protopterus aethiopicus*, sowohl vom Südamerikanischen Lungenfisch *Lepidosiren para-*

* ΑΝΑΣΤ. ΧΡΗΣΤΟΜΑΝΟΥ ΚΑΙ FRIEDRICH REINHARD, Ἡ αἰμοσφαιρίνη τοῦ διπνεύστου ἰχθύος *Protopterus aethiopicus*. Aus dem Laboratorium für molekulare Marine Biochemie und Biologie St. George, Limni auf Euböa.

doxa, als auch vom Australischen *Neoceratodus forsteri* zu unterscheiden, genau wie beide letztere unter sich. Der Afrikanische Lungenfisch von dem die Rede in der vorliegenden Arbeit ist, lebt in verschiedenen Sümpfen und Seen Afikas, wie z.B. rings um den Tschad-See¹, den mittleren Zambesi² und anderen Seen Zentralafrikas, sowie in

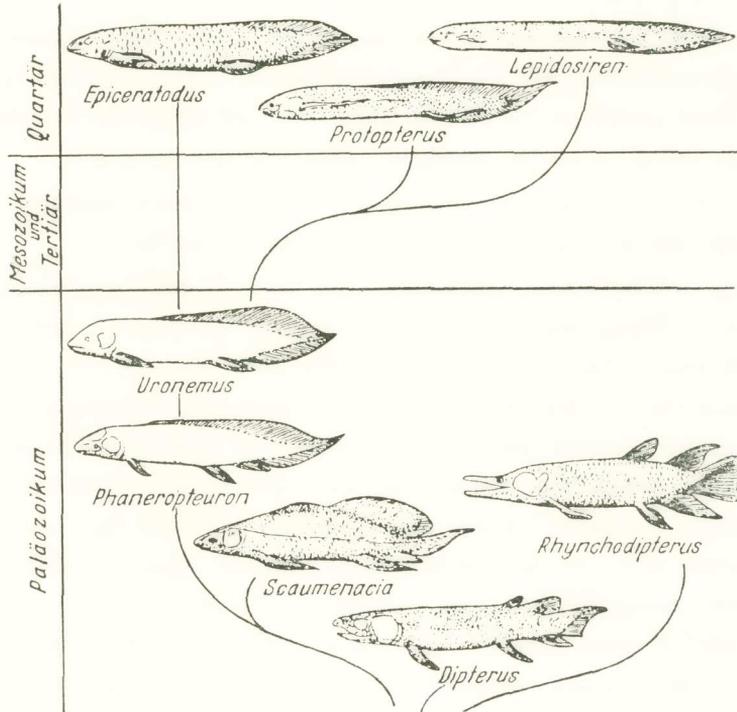


Fig. 1. Evolution der Lungenfische. Bemerkenswert ist das Fehlen von Zwischenstufen im Mesozoikum und Tertiär.

der Gegend um Dakar³. Das Hämoglobin des *Polypterus aethiopicus* wie aus den hier dargelegten Untersuchungen hervorgeht, zeigt eine ausgesprochene Polymorphie, wie dieses hauptsächlich bei den Myxinen festgestellt worden ist.

1. J. R. Norman: Die Fische, In Deutscher Übersetzung Verl. P. Parey, Hamburg und Berlin, 1966, p. 359.

2. P. B. Jackson: Nature, Vol. 182, 1958, p. 123.

3. T. Mohsen and R. Codet: Nature, Vol. 185, 1960, p. 108.

Material und Methoden.

Das Blut wurde von einem von uns von Exemplaren der nahe dem Tschad-See (Nigeria) lebenden *Protopterus aethiopicus* durch Herzpunktion gewonnen. Das Blut wurde in 2.5 % (4° - 5°) Natriumcitratlösung aufgefangen und die Erythrocyten durch Zentrifugieren bei 500 u. Min. vom Plasma getrennt.

Die Erythrocyten wurden dreimal mit 2.1 % NaCl gewaschen und die Aufschwemmung der Erythrocyten in der NaCl Lösung, in kleinen bis zum Rand gefüllten Polyäthylenfläschen, per Flugzeug in einer Thermosflasche bei 3° - 5°, zum hiesigen Laboratorium versandt.

Bei der Ankunft der Sendung wurden ausser einigen wenigen Gerinnseln, ein leichter Grad von Hämolyse beobachtet.

Nach wiederholten zentrifugieren und dreimaligen Waschen mit 2.1 % NaCl Lösung wurden die Erythrocyten bei 5000 U. Min. getrennt und unter Zusatz des doppelten Volumens dest. Wassers und 2 ml Tetrachlorkohlstoffs 12 Stunden unter gelegentlichen Schütteln zuerst im Eisschrank und danach weitere 12 Stunden bei Zimmertemperatur belassen. Danach wurde das Hämolysat während 50 Min. bei 6000 U. Min. zentrifugiert, die klare Lösung von Zellteilen getrennt und ein CO Strom durchgeperlt. Die CO-Hb Lösung wurde danach einer 36 stündigen Dialyse gegen dest. Wasser und danach 6 Stunden gegen einen 0.013 M. Tris-EDTA-Borat Puffer von pH 9.1 dialysiert. Danach wurde die dialysierte Hb-Lösung wieder einer Zentrifugation bei 5000 u. Min. unterworfen und die vollkommen klare Lösung gut verschlossen bei— 20° für weitere Versuche aufbewahrt.

Elektrophorese: Als Trägermedien für die Elektrophorese wurden Filtierpapier als auch Azetatzellulosestreifen (Sephaphore III, Gelman, Ann Arbor) benutzt. Weiter wurden für den gleichen Zweck Cellogel Folien (Chemetron, Mailand-Serva Heidelberg) und Stärkegel angewandt.

Für die Elektrophoresen, wurde ein Tris-EDTA-Borsäure System von 0.13 M und 9.1 pH verwendet.

Für die Stärkegelelektrophorese wurde sowohl ein Tris-EDTA-Borsäure System von pH 9.1, als auch ein diskontinuierliches von pH

8.8, bzw. 8.2 verwendet. Tris-EDTA-Borsäure 110g/585g/30.9g. Die Lösung entspricht gelöst in 1 l. dest. Wasser einer M. Lösung von 0.08 und zeigt ein pH von 8.6. Diese Grundlösung wird für die Zubereitung des Gels auf 1:20 verdünnt. Für die Anodenkammer wurde die Verdünnung 1:5 und für die Kathodenkammer 1:7. Auf 100 ml Gelpuffer kommen 10g. Stärke (Hydrolysed Starch, Connaught Lab.)

Die angewandten Spannungen und Zeiten waren für die Papierelektrophorese 2-4 St. bei 120-140 V. Für die Azetatzellulosestreifen kam eine Spannung von 500 V und Zeiten von 75 Min. bis 100 Min. in Frage. Für die Cellogelelektrophorese wurden Spannungen von 140-200 V. angewandt bei 4-6 Stunden Zeitdauer.

Für die Stärkegelelektrophorese wurden Spannungen von 140-200 V angewandt die Stromstärken bis zu 10 mA zuließen, Zeitdauer 12-18 St.

In allen Versuchen, und hauptsächlich bei den Azetatcellulose- und den Cellogelstreifen, wurde auf gute Kühlung während der Elektrophorese gesorgt. Das gleiche wurde bei Stärkegelelektrophorese, durch Durchleiten von Eiswasser unter dem Stärkegel, angewandt.

Die Färbung der Elektrophoresestreifen erfolgte nach den üblichen Methoden, entweder mit Ponceau S, oder mit Amidoschwarz. Für Ponceau S: 500 mg Farbstoff in 100 ml 5% Trichloressigsäure gelöst. Für Amidoschwarz: 2 g Farbstoff in 1000 ml der oben angegebenen Entfärbelösung für diesen Farbstoff. Färbedauer für beide Färbemittel mindestens 5 Min. Im ersten Fall wird mit 5% Essigsäure entfärbt, im zweiten Fall mit einer Mischung von Methanol/Wasser/conc. Essigsäure: 454/454/92.

Nach der Entfärbung werden die Papierfiltrierstreifen zum Trocknen aufgehängt, während die Azetatzellulosestreifen zuerst zwischen Filtrierpapier vom überschüssigen Entfärbungsmittel getrocknet werden und gleich danach zwischen zwei Glassplatten mindestens 24 St. zum Trocknen überlassen werden. Frühzeitiges herausnehmen verursacht Schrumpfung der Streifen.

Die Cellogelstreifen werden auch vom überschüssigen Entfärbungsmittel oberflächlich getrocknet und in einer 20% Formalinlösung für 3 Minuten belassen. Danach werden die Streifen für 5 Min. in einer 7% Glycerinlösung getaucht. Gleich danach werden sie auf einer Glasplatte

fest angelegt, und bei 80° im Brutschrank getrocknet. Längeres, oder höheres Erhitzen schädigt die Streifen, welche sofort nach dem Trocknen von der Glasplatte abgelöst werden können. Sämtliche nach der obigen Methoden hergestellte Streifen, können nach dem Trocknen photographiert werden. Die oben beschriebenen Elektrophoresen wurden auch mit einem Phosphatpuffer von pH 6.5, Ion. St. 0.9 wiederholt. NaH_2PO_4 . $\text{H}_2\text{O} = 1.175 \text{ g} + 7.5 \text{ Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O g}$ auf 1 lit. dest. Wasser.

RESULTS

Absorptionsmaxima.

Das Hämoglobin des *Protopterus aethiopicus* zeigt in einem Tris-EDTA-Borat Puffer von pH 9.1, 0.13 M in der Oxyform folgende Absorptionsmaxima in μ 575, 540, 416, 345 und 278.

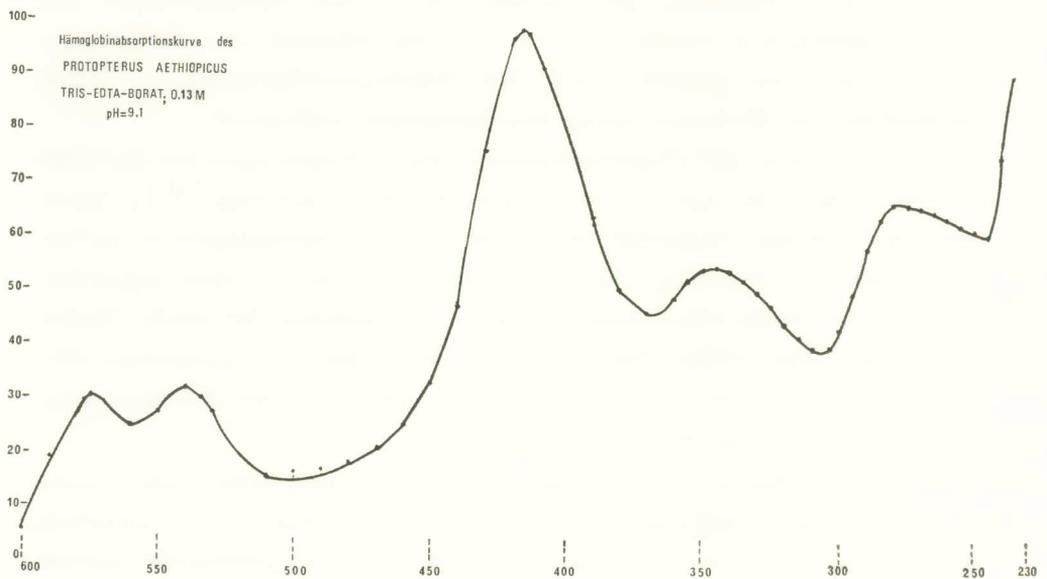


Fig. 2. Absorptionskurve des nativen Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus*.

Elektrophoretische Analyse.

Die Elektropherogramme ergaben dass das Hämoglobin des *Protopterus aethiopicus* hochgradig heterogen ist.

Bei der Papierelektrophorese konnte keine Trennung der Kompo-

nenten erzielt werden, da das Hämoglobin mehr oder weniger als breite ziemlich kompakte Zone zur Anode wanderte. Nur in der Mitte des Hämoglobinbandes konnte man eine Farbintensivierung feststellen.

Die Celluloseazetat Elektropherogramme (Fig. 3a und 3b sowie 3c) ergaben eine Trennung in mindestens 7 - 8 Komponenten.

Nach der Stärke der Färbungen mit Ponceau S und Amidoschwarz zu urteilen, sind von der Kathode ausgehend, die erste, die zweite, die dritte und die sechste Komponente als Hauptkomponenten zu betrachten, während die dritte, die fünfte bis zur zehnten, als Nebenkomponten in kleineren Konzentrationen vorkommen. Die dritte Komponente ist bei den Celluloseazetatstreifen in zwei schwachen Banden gespalten. Diese Dualität der dritten Komponente ist bei der Elektrophorese mit Cellogel sehr ausgeprägt (Fig. 4b).

Es ist zu bemerken, dass die Stärkegelelektrophorese keine brauchbare Trennung des Hämoglobins in den verschiedenen Komponenten erlaubte, indem weder bei pH 9,1, noch bei pH 6,5 zufriedenstellende Ergebnisse erzielt wurden.

DISKUSSION

Aus den vorerwähnten Resultaten ist die hohe Heterogenität des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* nahe gelegt worden. Die beste Trennung sämtlicher zur Anode wandernden Komponenten, deren Zahl sich auf 9 - 10 beläuft, wird durch die Elektropherogramme bei pH 9,1 auf Celluloseazetatstreifen erhalten. Dabei ist zu bemerken dass in den ersten 30 - 40 Minuten noch keine Trennung zu beobachten ist, indem das Hämoglobin als breite homogene Bande wandert. Die Trennung erfolgt nach dieser Zeit, und ist nach ca 90 - 120 Min. beendet. Dieses Verhalten legt den Gedanken nahe, dass die vier oder fünf nahe beieinander wandernden Komponenten, eine ziemlich ähnliche Aminosäurezusammensetzung haben müssen. Drei oder vier, anodisch sehr schnell wandernden, schwach sichtbaren Komponenten sind auf den photographischen Bildern nicht gut zu erkennen. Sie entsprechen Komponenten mit hoher negativer Ladung.

Die Elektrophorese bei pH 9,1 mit den Cellogel-Folien ergab schärfere Bilder bei denen bis zu 8 Komponenten gut unterschieden

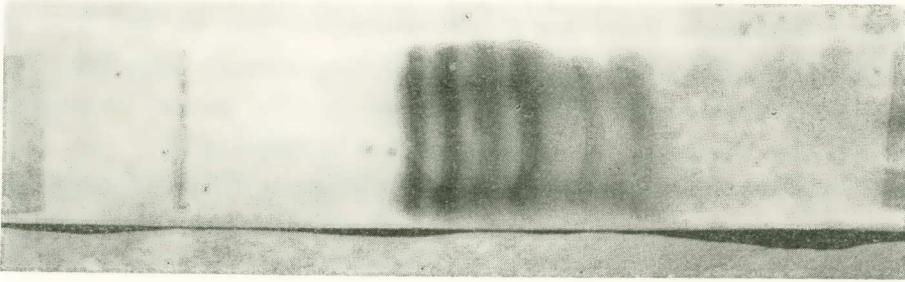


Fig. 3a. Elektropherogramm des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* auf Azetatcellulose, pH 9. I. 500 V. I. 5 mA, 90 Min.

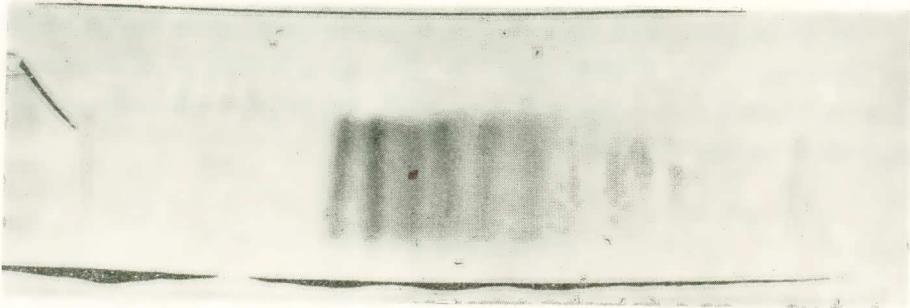


Fig. 3b. Elektropherogramm des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* auf Azetatcellulose, pH 9. I. 500 V. I. 5 mA, 90 Min.

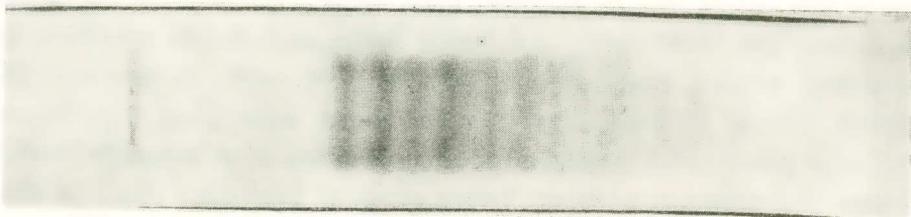


Fig. 3c. Elektropherogramm des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* auf Azetatcellulose, pH 9. I. 500 V. I. 5 mA, 110 Min.

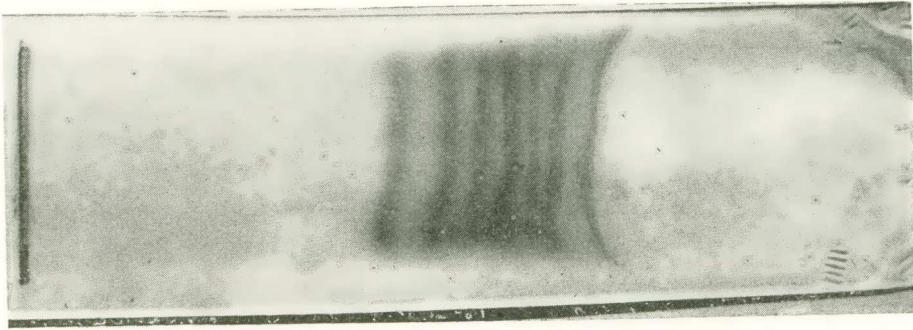


Fig. 4a. Elektropherogramm des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* auf Cellogel, pH 9. I. 140-150 V, 1.0 mA, 4-5 Stunden.

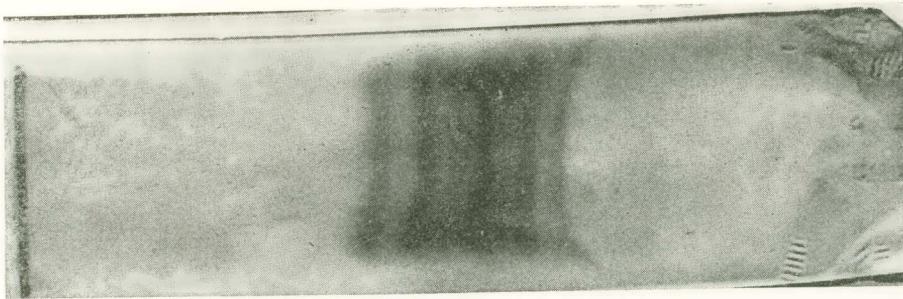


Fig. 4b. Elektropherogramm des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* auf Cellogel, pH 9. I. 140-150 V, 1.0 mA, 4-6 Stunden.

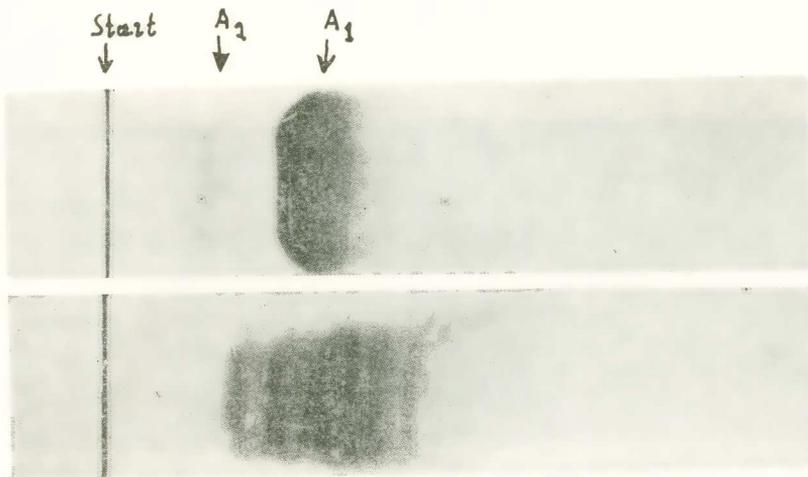


Fig. 4c. Vergleichende Elektrophorese des Humanhämoglobins (oben) und des Hämoglobins des *Protopterus* (unten) auf Azetatcellulose, pH 9. I. 140 V. 0.2 mA. während 95 Minuten.

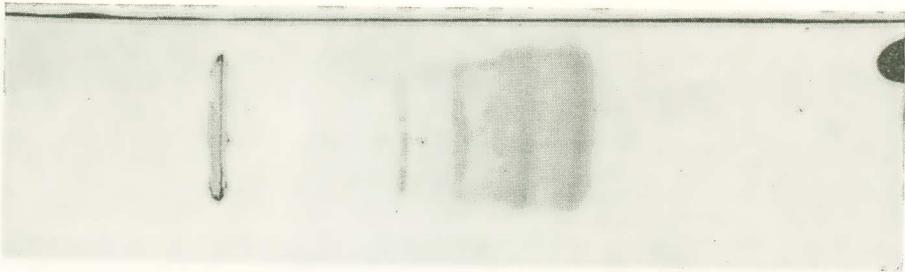


Fig. 5a. Elektropherogramm des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* auf Azetatcellulose, pH 6.5, 450 V, 2 mA, 120 Minuten.

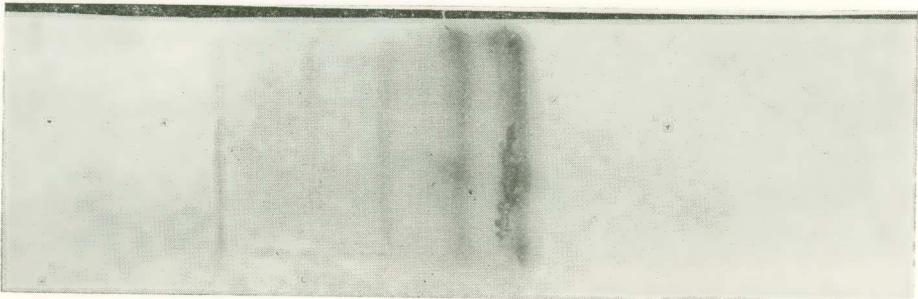


Fig. 5b. Elektropherogramm des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* auf Cellogel, pH 6.5, 140 V, 4-5 mA, 4 Stunden.

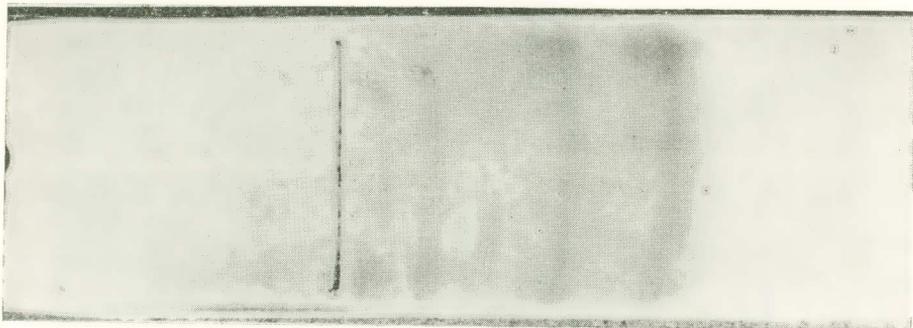


Fig. 5c. Elektropherogramm des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* auf Cellogel, pH 6.5, 140 V, 4-5 mA, 6 Stunden.

werden konnten. Bei den abgebildeten Elektropherogrammen sind die anodisch schneller wandernden nicht scharf zu unterscheiden, Bild 4a und 4b.

Bei pH 6,5 hat sich neben den Azetatzellulosestreifen auch die Cellogel-Folien bewährt, dabei wandern, wie zu erwarten war, alle Banden kathodisch, aber unter einem ganz anderen Bild, da sich knapp nach 20 Minuten nach Beginn der Elektrophorese zwei Banden bilden die bei der Azetatcellulose erst nach 60 Minuten, und bei der Elektrophorese mit den Cellogel Folien in mehreren dicht nebeneinander liegenden Banden zerfallen, die eine Differenzierung von 7-8 Komponenten erlauben.

Die Differenzierung der Banden ist durch die beigefügten densitometrischen Bilder sowohl bei pH 6,5 als auch bei pH 9,1 gut ersichtlich, (Fig. 6 und 7).

Der Polymorphismus der Hämoglobine ist eine weitverbreitete Erscheinung⁴ bei den niederen Vertebraten und Avertebraten. Die Ursachen dieser Heterogenie könnte auf eine phylogenetische Descendenz beruhen, oder auch auf eine ontogenetisch bedingte grössere Adaptationsmöglichkeit gegenüber dem Sauerstoffangebot unter veränderten Lebensbedingungen.

Die Luftatmende Tiere zeigen einen viel kleineren Grad von Heterogenie, gegenüber den Tieren die ihren Sauerstoff aus dem Wasser aufnehmen müssen.

Die Lungenfische waren und sind Süßwasserfische die in einen Milieu leben welches nicht immer und gleichmässig den nötigen Sauerstoff zuführt, darum ist es verständlich, auf Grund der oben erwähnten Annahme, dass sie ein Polymorphes Hämoglobin besitzen.

Da die Lungenfische und hauptsächlich der *Epiceratodus forsteri* nur geringe Unterschiede gegenüber ihren Vorfahren aufweisen, und als «lebende Fossilien» bezeichnet werden können, müsste die Kenntnis der Aminosäurezusammensetzung und der Sequenz ihrer Hämoglobine von grössten Interesse für die vergleichende Physiologie

4. H. J a m a n a k a, K. Y a n a g u c h i and F. M a t s u u r a: Bull. of the Jap. Soc. of Scient. Fisheries, Vol. 31, 1965, p. 827, ibidem, Vol. 31, 1965, p. 833.

und molekulare Biologie bedeuten. Dementsprechende Arbeiten sind im Gang.

Die Absorptionsmaxima des Gesamthämoglobins in gepufferter Tris pH 9.1 Lösung entsprechen ziemlich vollkommen denen der *Myxine Glutinosa*⁵.

Die vergleichende Elektrophorese des Lungenfisch Hb und des Human Hb bei pH 9.1, mit den schon erwähnten Tris-Puffer, ergab dass

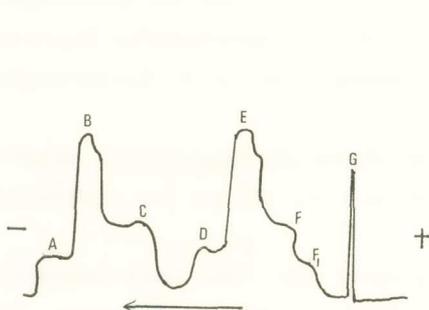


Fig. 6. Densitometrische Differenzierung der Komponenten bei der Elektrophorese bei pH 6.5.

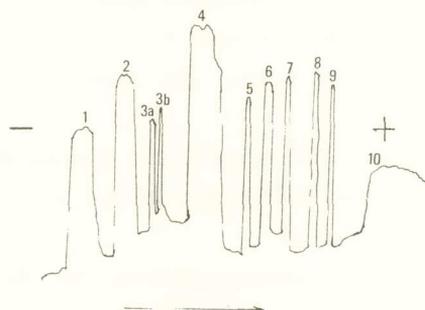


Fig. 7. Densitometrische Differenzierung der Komponenten bei der Elektrophorese bei pH 9.1.

die langsam wandernden Komponenten 7-8 des Protopterus Hb schneller als das Humanhämoglobin A_1 wandern, während die Hb Komponenten 1-3 sich schneller als das Hb A_1 bewegen.

Die Hb Komponenten 4 und 5, bei manchen Versuchen auch die Komponenten 3-6, bewegen sich gleich schnell mit dem Human Hb A_1 (Fig. 4c).

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Elektrophorese bei pH 9.1 und pH 6.5 unter Anwendung von Azetatcellulosestreifen und Cellogel Folien war eine Heterogenität des Hämoglobins des *Protopterus aethiopicus* feststellbar. Es wurden 7-8 Komponenten festgestellt. Keine der Komponenten bewegte sich bei einem niedrigen pH anodisch. Die Absorptionsmaxima der gepufferten Gesamt-

5. Sven Paläus, Ol. Vesterberg and Cisela Liljeqvist: Comp. Biochem. Physiol. Vol. 39 B, 1971, p. 551.

hämoglobinlösung (Oxy-) wurden zu 575, 540, 416, 345 und 278 mμ bestimmt. Diese Werte entsprechen zum grössten Teil denen des Hämoglobins der *Myxine Glutinosa*.

S U M M A R Y

By electrophoresis at pH 9.1 and pH 6.5 using strips of acetatcellulose and Cellogel we could prove the Heterogenity of the Hemoglobin of the *Protopterus aethiopicus*.

Eight to nine components could be detected. None of these components are moving anodically at pH 6.5.

The Absorption Maxima of the buffered Oxy Hemoglobin solutions were determined at 575, 540, 416, 345 and 278 mμ, which values are very similar to the Hemoglobin of *Myxine glutinosa*.

R É S U M É

Par électrophorèse en tampon Tris-EDTA-Borat pH 9,1 et en tampon Phosphate-Borate pH 6.5 sur acétate de cellulose et aussi sur bandes de Cellogel nous avons constaté la hétérogénéité de l'hémoglobine du *Protopterus aethiopicus*.

Sept à huit composantes on pu être prouvées. Aucune de ces composantes ne montre un mouvement anodique. Les solutions tamponnées de l'oxyhémoglobine montrent un spectre d'absorption à maxima 575, 540, 416, 345, 278 mμ. Ces valeurs ressemblent à celles de l'hémoglobine du Cyclostome *Myxine glutinosa*.

★

Κατὰ τὴν ἀνακοίνωσιν τῆς ἀνωτέρω ἐργασίας ὁ ἀκαδημαϊκὸς κ. **Ν. Λοῦρος** εἶπε τὰ κάτωθι :

Ὁ κ. Ἀναστάσιος Χρηστομάνος, υἱὸς τοῦ ἀειμνήστου Καθηγητοῦ Ἀντωνίου Χρηστομάνου, Ὁμότιμος Καθηγητὴς τοῦ Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, κατέξασ τὴν ἔδραν τῆς Βιολογικῆς Χημείας καὶ νῦν μέλος καὶ συνεργάτης τοῦ Ἰνστιτούτου Max Planck ἐν Μονάχῳ Βαυαρίας, εἶναι γνωστὸς εἰς τὴν Ἀκαδημίαν, εἰς τὴν ὁποίαν πρό τινων μηνῶν ὁ συνάδελφος κ. Ἰωακείμογλου παρουσίασε τὸν πρῶτον τόμον τοῦ εἰς τὴν Γερμανικὴν ἐκδοθέντος ἀξιολογητάτου ἔργου αὐτοῦ περὶ τῆς ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΩΝ, τὸ ὁποῖον ἀπέσπασε πολλοὺς ἐπαίνους ὑπὸ τῆς διεθνοῦς κριτικῆς. Ἦδη, ἀπὸ δεκαετίας καὶ πλέον, ἀσχολεῖται ὁ κ. Χρηστομάνος μὲ τὴν μελέτην τῶν αἰμοσφαιρινῶν τῶν κατωτέρων

σπονδυλωτῶν καὶ ἀσπονδύλων δημοσιεύσας σχετικῶς σειρὰν πρωτοτύπων ἔρευνῶν. Ἡ παροῦσα ἔρευνα, τὴν ὁποίαν ἔχω τὴν τιμὴν νὰ παρουσιάσω εἰς τὴν Ἀκαδημίαν, πραγματεύεται περὶ τῆς αἰμοσφαιρίνης τῶν σπανίων διπνεύστων ἰχθύων καὶ δὴ καὶ τοῦ Ἀφρικανικοῦ *Protopterus aethiopicus*. Ὁ ἰχθύς οὗτος μετὰ τῶν ἐπίσης σπανίων συγγενῶν αὐτοῦ, τοῦ *Epiceratodus forsteri* τῆς Αὐστραλίας καὶ τοῦ *Lepidosiren paradoxo* τῆς Νοτίου Ἀμερικῆς, ἀποτελοῦν ζῶντα ἀπολιθώματα, ἤτοι εἶναι ἀπόγονοι διπνεύστων ἰχθύων, οἵτινες ἔζησαν κατὰ τὴν σιλούριον περίοδον, δηλαδὴ πρὸ 400 ἑκατομμυρίων ἐτῶν. Εἰς τὴν πραγματείαν του ταύτην ὁ κ. Χρηστομάνος μετὰ τοῦ συνεργάτου του *Reinhard*, ὅστις συνέλεξε τὸ αἷμα τῶν ἰχθύων τούτων ἐκ τῆς Λίμνης *Tschad* τῆς Νιγηρίας, ἀπέδειξε διὰ διαφόρων μεθόδων ἠλεκτροφορήσεως εἰς διάφορα PH, ὅτι ὁ ἰχθύς οὗτος κέκτηται 7-8 διαφόρους αἰμοσφαιρίνας. Ἡ πολυμορφία αὕτη τῶν αἰμοσφαιρινῶν προέρχεται πιθανῶς εἴτε ἐκ φυλογενετικῆς ἐξελίξεως, εἴτε, ὅπερ καὶ πιθανότερον, ἐκ τῆς ὄντογενετικῆς προσαρμογῆς τῶν ἰχθύων τούτων, οἵτινες ζοῦν εἰς τὰ γλυκὰ ὕδατα, πρὸς τὰς ἀνάγκας τοῦ ὄργανισμοῦ αὐτῶν εἰς ὀξυγόνον. Καθ' ὅτι ὡς ζῶντες εἰς τέλματα ἢ ἀποξηρανομένας κατὰ τὸ θέρος λίμνας, ἀναγκάζονται νὰ προσλαμβάνουν τὸ μὲν θέρος τὸ ἀναγκαιοῦν ὀξυγόνον ἐκ τοῦ ἀέρος, ἐνῶ τὸν χειμῶνα ἀναπνέουν τὸ ἐν τῷ ὕδατι διαλελυμένον ὀξυγόνον. Συνεπῶς ἔχουν ἀνάγκην αἰμοσφαιρινῶν, αἵτινες ὄχι μόνον διαφέρουν ὡς πρὸς τὸν λειτουργικὸν αὐτῶν μηχανισμόν, ἀλλὰ καὶ ὡς πρὸς τὴν ἐξ ἀμινοξέων σύνθεσιν αὐτῶν — ὡς τοῦτο καταφαίνεται ἐκ τῶν πολλῶν διαφόρου ἠλεκτροφορητικῆς ιδιότητος ἔχουσῶν αἰμοσφαιρινῶν. Ἡ ἔρευνα αὕτη εἶναι ἡ τὸ πρῶτον ἐπὶ τῆς πολυμορφίας τῶν αἰμοσφαιρινῶν τῶν ἰχθύων τούτων δημοσιευομένη.

Ὡς δὲ παρατηρεῖ ὁ συγγραφεύς, ἡ αἰμοσφαιρίνη τοῦ *Protopterus aethiopicus* δεικνύει σχεδὸν τὸ αὐτὸ φάσμα ἀπορροφήσεως πρὸς τὰς αἰμοσφαιρίνας τῶν κυκλοστόμων ἰχθύων, οἱ ὁποῖοι εἶναι ὡσαύτως σήμερον ἀκόμη ζῶντα ὑπολείμματα μιᾶς μεγάλης τάξεως ἰχθύων τῶν καλουμένων ἀγνάθων, πρὸ ἔζησαν πρὸ 600 ἑκατομμυρίων ἐτῶν κατὰ τὴν κάμβριον περίοδον.

Πρόκειται δηλαδὴ περὶ ἐξαιρετικῶς ἐνδιαφερούσης μελέτης ἀφορώσης εἰς τὴν παλαιοντολογία, τὴν ὄντολογία καὶ τὴν βιολογία.

Διὰ λεπτομερείας παραπέμπω εἰς τὴν ἐκτενῆ ἐργασίαν τοῦ κ. Χρηστομάνου πρὸς συνοδεύεται ὑπὸ πολλῶν ἀποδεικτικῶν ἠλεκτροφορητικῶν φασμάτων, διαγραμμάτων, χαρτῶν καὶ πινάκων καὶ ἡ ὁποία θὰ δημοσιευθῇ εἰς τὰ Πρακτικὰ τῆς Ἀκαδημίας.