

АНОТАЦІЯ

Добровольський С. Є. Псевдозубі птахи (Aves: Odontopterygiformes) еоцену північного Тетису: гістологічний аналіз та реконструкція екологічних особливостей. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – «Біологія». Інститут зоології імені І. І. Шмальгаузена НАН України, Київ, 2024.

В дисертаційній роботі досліджено гістологічну будову довгих кісток птахів викопного ряду Odontopterygiformes та її зв'язок з біологічними, зокрема екологічними, особливостями групи. Раніше гістологічна будова кісток Odontopterygiformes, за винятком псевдозубів, досліджена не була. Таким чином, всі реконструкції способу життя, індивідуального розвитку та екологічної ніші цих птахів базувалися в основному на макроскопічних ознаках кісток. Водночас мікроскопічна будова кісток тетрапод, насамперед діафізів довгих кісток кінцівок, є найкращим джерелом інформації щодо тривалості їхнього росту і може стати підґрунтям для деяких висновків щодо їхніх екологічних характеристик, систематичного положення та перебігу онтогенезу (Horner et al., 2001; Bailleul et al., 2019; de Buffrénil et al., 2021a; Chinsamy, 2023).

Дослідження виконане на матеріалі з колекції Національного науково-природничого музею НАН України (м. Київ). Цей матеріал походить із ранньолітського місцезнаходження Ікове (Луганська область) і містить довгі кістки двох видів Odontopterygiformes: *Lutetodontopteryx tethyensis* Mayr et Zvonok, 2012 та cf. *Dasornis* sp. Ці види представляють обидві основні класи ряду, відмінності яких досягають рівня окремих родин (Bourdon et al., 2010; Зеленков и Курочкин, 2015). Виготовлення шліфів здійснювалося за оригінальним варіантом методики, а дослідження – шляхом звичайної та поляризаційної світлової мікроскопії. Обробка знімків та вимірювання на них розмірів та інших характеристик елементів мікроструктури (лакун остеоцитів

та судинних каналів) здійснювалися за допомогою оригінальних скриптів. Перед виготовленням препаратів виконувалося звичайне та стереоскопічне фотографування кісток, а для зразків доброї збереженості – виготовлення тривимірних моделей.

Виявлено, що гістологічна та мікроанатомічна будова довгих кісток *Odontopterygiformes* подібна до будови кісток сучасних представників *Neognathae* (клади, до якої відносять *Odontopterygiformes*, хоча існують і ознаки, що свідчать проти цього: Maug, 2017). Це вказує на такий самий характер росту і порівнянню його тривалість: у молодих птахів кістка швидко наростала зовні і резорбувалася всередині, після чого швидкість наростання (апозиції) в більшості випадків різко падала. За даними для сучасних птахів, це падіння зазвичай близьке за часом до набуття здатності до польоту (Atterholt & Woodward, 2021). Під час швидкого росту утворювалася грубоволокнисто-паралельна (фіброламельярна) тканина, апозиція якої зазвичай іде зі швидкістю в десятки мікрометрів на добу, а під час повільного – пластинчаста, яка відкладається на порядок повільніше (de Margerie et al., 2002; de Margerie et al., 2004; de Buffrénil et al., 2021b). Медулярної тканини у досліджених кістках не спостерігалось.

Подібна мікроструктура кісток спостерігається не тільки у *Neognathae*, а й у деяких викопних птахів за межами групи *Neornithes*, зокрема *Hesperornis*, *Ichthyornis* (Houde, 1987; Chinsamy et al., 1998) та *Confuciusornis* (de Ricqlès et al., 2003). У загальних рисах вона подібна і до мікроструктури кісток *Paleognathae*, яка відрізняється розповсюдженістю ламінарної фіброламельярної тканини (Houde, 1987; Chinsamy et al., 1995; Castanet et al., 2000; Legendre et al., 2014, Kuehn et al., 2019), рідкісної у неогнат (Atterholt & Woodward, 2021), та ліній росту в фіброламельярній тканині (Bourdon et al., 2009; de Ricqlès et al., 2016; Canoville et al., 2022).

Між мікроструктурою кісток *Lutetodontopteryx tethyensis* та cf. *Dasornis* існують відмінності. У досліджених плечових кістках *L. tethyensis*

первинні остеони мають набагато чіткіші межі, ніж у cf. *Dasornis*, а напрямки цих остеонів на поперечному зрізі виглядають більш впорядкованими.

Річних ліній зупинки росту, притаманних багатьом раннім і окремим сучасним птахам (Chinsamy, 2002; Turvey et al., 2005; Bourdon et al., 2009; Chinsamy & Worthy, 2021; Canoville et al., 2022), у фіброламельярній тканині досліджених видів не виявлено, що свідчить про ріст у межах одного року (на відміну від попередніх припущень щодо швидкості росту великих *Odontopterygiformes*: Louchart et al., 2013, 2018). Зі швидким ростом узгоджуються грубі орієнтовні оцінки швидкості апозиції грубоволокнисто-паралельної тканини на основі її мікроструктурних параметрів та залежностей цих параметрів від швидкості апозиції, виведених для сучасних видів. У плечових кістках *Lutetodontopteryx tethyensis*, але не cf. *Dasornis* sp., виявлено нетиповий для птахів (наявний лише у деяких видів, насамперед із великим розміром тіла) поступовий перехід між грубоволокнисто-паралельною та пластинчастою тканиною, що вказує на поступове, а не різке, сповільнення апозиції.

Дані про тривалість росту дають можливість зробити певні екологічні висновки. Якби великі *Odontopterygiformes* росли більше року, як це припускалося раніше (Louchart et al., 2013, 2018), вони не могли б спеціалізуватись на живленні кальмарами, тому що чисельність останніх зазвичай сильно варіює в межах року (Luckhurst, 2018). Разом із тим морфологія псевдозубів *Odontopterygiformes* краще сумісна з живленням кальмарами, ніж рибою (Olson, 1985; Maug, 2019). Швидкий розвиток птахів робить спеціалізацію на кальмарах можливою. Примітно, що кальмари вирізняються серед морських тварин (зокрема головоногих моллюсків) низьким вмістом кальцію (Özden & Erkan, 2011), а його нестача призводить до посиленої резорбції кісток (Zhao et al., 2020). Таким чином, серед причин резорбції, яка спостерігається в деяких кістках *Odontopterygiformes* (див. нижче), може бути живлення кальмарами.

На відміну від фіброламельярної тканини, у зовнішньому та внутрішньому шарах пластинчастої кісткової тканини *Odontopterygiformes* ростові шари існують. У багатьох видів сучасних птахів такі шари досліджували на предмет того, чи відбивають вони річні цикли, що дало б можливість визначати за ними вік птахів. Результати вийшли суперечливими (Drozdowska & Meissner, 2014; Клевезаль и Смирин, 2016). В дисертації встановлено, що у cf. *L. tethyensis* період відкладення цих шарів становив набагато менше року (як видно з наявності десятків шарів у стегновій кістці молоді особи Av-26), і вони не дають можливості встановити вік особи. Для cf. *Dasornis* sp. питання про період відкладення таких шарів залишається відкритим.

У одному зразку – плечовій кістці cf. *L. tethyensis* Av-8 – виявлено темні та світлі на поперечному зрізі лінії, що відображають колишні положення поверхні кістки під час її росту. Виходячи з товщини цих ліній та проміжків між ними, а також із типової швидкості відкладення фіброламельярної тканини, вони відкладалися за час порядку годин і, таким чином, є слідами якихось короткотривалих подій. Це питання може бути з'ясоване в майбутньому після кращого дослідження впливу зовнішніх та внутрішніх факторів на остеогенез сучасних птахів.

В кістках *Odontopterygiformes* виявлено прояви ремоделювання, які несуть інформацію про перебіг онтогенезу. Так, у стегнових кістках *L. tethyensis* (Av-18) та cf. *Dasornis* sp. (Av-34) первинна тканина майже повністю заміщена вторинними остеонами та резорбційними порожнинами, що означає масштабну резорбцію з подальшою реконструкцією. У більшості інших кісток ремоделювання теж існує, але більш помірне. Вторинні остеони, як правило, з'являються насамперед у внутрішньому шарі кортексу, а у Av-18 та Av-34 займають весь простір між зовнішнім та внутрішнім шарами пластинчастої тканини. У обох видів ремоделювання тривало і після досягнення скелетної зрілості. У *L. tethyensis* це спостерігалось в плечовій кістці (Av-11), а у cf. *Dasornis* sp. – у стегновій (Av-34). Масштабне

ремоделювання у птахів може бути спричинене відкладанням яєць та линянням (Cerda et al., 2014; De Ricqlès et al., 2016; Angst et al., 2017; Chinsamy et al., 2020b; Monfroy & Kunderát, 2021). В будь-якому разі масштаб ремоделювання зростає з віком і, таким чином, сильніше ремодельовані кістки за рівних інших умов належать старшим особинам. Це дає певну інформацію про індивідуальний вік птахів (так, серед стегнових кісток cf. *L. tethyensis* кістка Av-26 належала молодшій особині, ніж Av-18).

У шарі внутрішньої пластинчастої тканини стегнових кісток cf. *L. tethyensis* (Av-26) та cf. *Dasornis* sp. (Av-34) спостерігаються різкі зміни напрямку волокон, що означають часткове резорбування і подальше відновлення росту. В Av-26 прослідковуються сліди щонайменше чотирьох таких подій, а в Av-34 – однієї. Причини цього явища невідомі, хоча в літературі існують його згадки для птахів (Drozdowska & Meissner, 2014; de Ricqlès et al., 2016) та ссавців (Tomassini et al., 2021; Hieronymus et al., 2023). Припускають його зв'язок із потребою в кальції для розмноження або інших процесів (міграції, линяння), із недостатньою кількістю їжі або з потребою замінити тканину, що накопичила пошкодження від навантаження (Drozdowska & Meissner, 2014; Hieronymus et al., 2023). У випадку Av-34 можливі всі ці варіанти, а в випадку Av-26 молодість особини робить всі варіанти, крім проблем із живленням, малоймовірними.

Напрямок більшості кісткових волокон та судин у досліджених плечових кістках *Odontopterygiformes* є поздовжнім, а у стегнових вони проходять під великим нахилом до поздовжньої осі кістки. Це може мати біомеханічні причини: нахиленість волокон до поздовжньої осі збільшує міцність кістки стосовно навантаження кручення (De Margerie et al., 2005), якого зазнає стегнова кістка птахів при русі по землі. Кістки крила, особливо плечова, зазнають великого навантаження кручення у птахів із маховим польотом (De Margerie, 2006; Simons & O'Connor, 2012; Kuehn et al., 2019), до яких *Odontopterygiformes* не належали. Цим може пояснюватись те, що у сучасних птахів, які, подібно до *Odontopterygiformes*, мають ширяючий політ,

у плечовій кістці теж спостерігається напрямок волокон, ближчий до поздовжнього, а у досліджених птахів порівнянного розміру, але з іншими типами польоту, – ближчий до тангенційного (De Margerie et al., 2005; Simons & O'Connor, 2012). Таким чином, напрямок волокон і судин, спостережуваний у плечовій та стегновій кістках *Odontopterygiformes*, узгоджується з теоретично очікуваним і спостережуваним у інших птахів із їхнім типом польоту. Втім, інтерпретація напрямку кісткових волокон як адаптації до напрямку навантаження є спірною (Lee & Simons, 2015; Warshaw et al., 2017; Pratt et al., 2018; Kuehn et al., 2019).

На більшості досліджених кісток є прояви мікроскопічної біоерозії, найчастіше представлені тунелями Вєдля, походження яких пов'язують із грибами або ціанобактеріями. Спостерігаються також тунелі нетипової морфології, що вказує на таксономічну різноманітність організмів, які створювали тунелі. Біоєродованість кісток засвідчує їхню доступність мікроорганізмам недовзі після загибелі тварини і несе палеоекологічну та тафономічну інформацію про кістки та їхнє місцезнаходження.

Наукова новизна роботи. Вперше описано гістологічну будову довгих кісток *Odontopterygiformes* та її відмінності у двох досліджених видів, у різних їхніх скелетних елементах та у різних вікових стадій. Встановлено її подібність у загальних рисах до гістологічної будови кісток сучасних *Neognathae*. Отримано дані щодо швидкого (в межах року) росту великих *Odontopterygiformes*, що не підтверджує попередню оцінку і знімає обмеження на живлення цих птахів кальмарами. Виявлено, що напрямок волокон у довгих кістках *Odontopterygiformes* відповідає очікуваному у птахів із їхнім типом польоту і спостережуваному у їхніх сучасних екологічних аналогів. Вперше описано прояви мікроскопічної біоерозії з місцезнаходження Ікове.

Практичне значення роботи. Отримано результати, які можуть бути використані при визначенні фрагментарних знахідок птахів та при викладанні навчальних курсів із палеонтології. Запропоновано методика

виготовлення шліфів, яка не вимагає важкодоступних засобів і розрахована на отримання препаратів, добре придатних до поляризаційної мікроскопії та довготермінового зберігання. Сконструйовано обладнання для серійної нарізки твердих об'єктів та обладнання для поляризаційної мікроскопії і фотозйомки мікропрепаратів, яке придатне для роботи на неспеціалізованих мікроскопах із неспеціалізованими об'єктивами і дає можливість фотографувати при різних напрямках поляризаторів без повертання об'єкта, що полегшує порівняння та комбінування знімків. Написано програмне забезпечення для обробки мікрофотографій починаючи з етапу «сирих» даних із фотоматриці.

Ключові слова: птахи, *Odontopterygiformes*, палеогістологія, остеогістологія, швидкість росту, онтогенез, біоерозія, палеоген, еоцен.

ANNOTATION

Dobrovolsky S. E. Pseudo-toothed birds (Aves: Odontopterygiformes) of the Eocene of Northern Tethys: histological analysis and reconstruction of ecological features. – Manuscript.

The dissertation for obtaining the scientific degree of doctor of philosophy in Biological Sciences on the specialty 091 – "Biology". I.I. Schmalhausen Institute of Zoology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2024.

The dissertation is focused on the histological structure of long bones of the birds from the extinct order Odontopterygiformes and its relations to biological, particularly ecological, features of the group. Histological structure of the bones of Odontopterygiformes, with the exception of pseudoteeth, was not examined previously. Thus, all reconstructions of the way of life, individual development and ecological niche of these birds were based mainly on macroscopic features of the bones. However, microscopic structure of the bones, primarily the diaphyses of long bones of the limbs, is the best source of information about duration of tetrapod growth and can enable other developmental, ecological and taxonomic conclusions (Horner et al., 2001; Bailleul et al., 2019; de Buffrénil et al., 2021a; Chinsamy, 2023).

The study was conducted on the material from Early Lutetian locality Ikove (Luhansk region). The collection is housed in National Museum of Natural History at the National Academy of Sciences of Ukraine (Kyiv) and contains long bones of two species of Odontopterygiformes: *Lutetodontopteryx tethyensis* Mayr et Zvonok, 2012 and cf. *Dasornis* sp. These species represent both main clades of the order. Differences of these clades reach the level of separate families (Bourdon et al., 2010; Зеленков и Курочкин, 2015). Thin sections were made using the original version of the technique. The study of the material was carried out by ordinary and polarized light microscopy. Processing of the microphotographs and measurement of the sizes and other characteristics of microstructure elements (osteocyte lacunae and vascular channels) were carried out using original scripts.

Before the preparation of thin sections, usual and stereoscopic photography of the bones was carried out. In the case of well-preserved specimens, three-dimensional models were also made.

Histological and microanatomical structure of the long bones of Odontopterygiformes was found to be similar to the structure of bones of recent representatives of Neognathae (the clade to which Odontopterygiformes are referred, although some features possibly contradict this: Mayr, 2017). This indicates the same pattern of growth and its comparable duration: in young birds, the bone grew rapidly on the outer side and was resorbed on the inner, and later the rate of apposition in most cases dropped sharply. According to data for modern birds, this decline is usually close in time to fledging (Atterholt & Woodward, 2021). During rapid growth, woven-parallel (fibrolamellar) tissue was formed, which is usually apposited at the rate of tens of micrometers per day, and during slow growth, lamellar tissue was formed, which is apposited an order of magnitude slower (de Margerie et al., 2002; de Margerie et al., 2004; de Buffrénil et al., 2021b). Medullary tissue was not found in the examined bones.

Similar bone microstructure is observed not only in Neognathae, but also in some fossil birds outside the Neornithes group, in particular *Hesperornis*, *Ichthyornis* (Houde, 1987; Chinsamy et al., 1998) and *Confuciusornis* (de Ricqlès et al., 2003). It is also generally similar to the bone microstructure of Paleognathae, from which it differs in the rarity of two features widespread in paleognaths: laminar fibrolamellar tissue (Houde, 1987; Chinsamy et al., 1995; Castanet et al., 2000; Legendre et al., 2014, Kuehn et al., 2019; Atterholt & Woodward, 2021) and growth lines in woven-parallel tissue (Bourdon et al., 2009; de Ricqlès et al., 2016; Canoville et al., 2022).

Microstructure of examined bones of *Lutetodontopteryx tethyensis* and cf. *Dasornis* differs. In the humeri of *L. tethyensis* primary osteons have much more sharp boundaries than in cf. *Dasornis*, and the direction of these osteons looks much more regular on the transverse section.

Annual growth lines, which are present in many early and some recent birds, were not found in the woven-parallel tissue of examined species. This supports growth within one year (on the contrary to previous estimates of the growth duration of large-bodied Odontopterygiformes: Louchart et al., 2013, 2018). Rough preliminary estimates of the rate of apposition of woven-parallel tissue, based on its microstructural parameters and on the dependence of these parameters on the rate of apposition derived for modern species, are consistent with rapid growth. In the humeri of *Lutetodontopteryx tethyensis*, but not cf. *Dasornis* sp., atypical for birds (present only in some species, primarily with large body size) gradual transition between woven-parallel and lamellar tissue was found, which indicates a gradual, rather than sharp, slowing of apposition.

Information on the duration of growth enables to draw certain ecological conclusions. If large Odontopterygiformes grew more than one year, as it was supposed (Louchart et al., 2013, 2018), they could not specialize in feeding on squid, because abundance of squids usually varies greatly throughout the year (Luckhurst, 2018). But morphology of Odontopterygiformes' pseudoteeth better corresponds to feeding on squids than on fish (Olson, 1985; Mayr, 2019). Rapid development of the birds makes specialization on squid possible. It is noteworthy that squids are distinguished among other marine animals (including cephalopods) by their low calcium content (Özden & Erkan, 2011). Such a diet can cause bone resorption (Zhao et al., 2020). Thus, feeding on squid can be among the causes of resorption, described in some Odontopterygiformes bones.

In contrast to woven-parallel tissue, outer and inner circumferential layers of Odontopterygiformes' bones possess growth marks. In many recent bird species these layers have been examined to see if they reflect annual cycles, which would enable determination of individual age of the bird. The results for recent birds were contradictory (Drozdowska & Meissner, 2014; Клевезаль и Смирин, 2016). In the dissertation, it was established that in cf. *L. tethyensis* these layers were deposited much more frequently than once a year (judging by the presence of dozens of layers in the femur of a young individual Av-26), and they do not show

the age of the individual. For cf. *Dasornis* sp. the period of deposition of such layers remains unknown.

One specimen, the humerus of cf. *L. tethyensis* Av-8, shows on the cross-section unusual dark and light lines, reflecting former positions of the bone surface during its growth. Judging from thicknesses of these lines and the gaps between them, given typical rate of deposition of fibrolamellar tissue, they were deposited over a period in the order of several hours and thus represent the traces of some short-term events. This question may be clarified in the future after a better study of the influence of external and internal factors on the osteogenesis of modern birds.

Bones of Odontopterygiformes show manifestations of remodeling, which carry information about the course of ontogenesis. Thus, in femora of *L. tethyensis* (Av-18) and cf. *Dasornis* sp. (Av-34) the primary tissue is almost completely replaced by secondary osteons and resorption cavities, which indicate extensive resorption with subsequent reconstruction. Most other bones also show manifestations of remodeling, but on a smaller scale. Secondary osteons, as a rule, appear first in the inner layer of the cortex, and in Av-18 and Av-34 occupy the entire space between the outer and inner circumferential layers. In both species, remodeling continued even after reaching skeletal maturity. In *L. tethyensis* this was observed in humerus (Av-11), and in cf. *Dasornis* sp. – in femur (Av-34). Extensive remodeling in birds can be caused by egg laying and molting (Cerda et al., 2014; De Ricqlès et al., 2016; Angst et al., 2017; Chinsamy et al., 2020b; Monfroy & Kunderát, 2021). In any case, the amount of remodeling increases with age, so, more strongly remodeled bones, other things being equal, belong to older individuals. This provides some information about the age of the individuals to which the examined bones belonged (for example, among the femora of cf. *L. tethyensis*, bone Av-26 belonged to a younger individual than Av-18).

Inner circumferential layer of femora of cf. *L. tethyensis* (Av-26) and cf. *Dasornis* sp. (Av-34) shows sharp changes in the direction of bone fibers, indicating partial resorption and subsequent restoration of apposition. Av-26

underwent at least 4 such events of reversal of apposition, and Av-34 – at least one. The reasons of this are unknown, although it was mentioned in the literature for birds (Drozdowska & Meissner, 2014; de Ricqlès et al., 2016) and mammals (Tomassini et al., 2021; Hieronymus et al., 2023). It can be related to the need in calcium for reproduction or other processes (migration, molting), to insufficient feeding, or to remodeling caused by the accumulation of stress damage (Drozdowska & Meissner, 2014; Hieronymus et al., 2023). In the case of Av-34 all these versions are possible, and in the case of Av-26 young age renders all them, except insufficient feeding, unlikely.

Direction of most bone fibers and vascular cavities in the examined humeri of Odontopterygiformes is longitudinal, and in the femora they are tilted to the bone axis. This difference can have biomechanical reasons. Inclination of the fibers to the longitudinal axis increases the strength of the bone in relation to torsional loading (De Margerie et al., 2005), which is experienced by bird femur during motion on the ground. Wing bones, especially humerus, experience strong torsional loading in the birds with flapping flight (De Margerie, 2006; Simons & O'Connor, 2012; Kuehn et al., 2019), to which Odontopterygiformes did not belong. Some works have found that recent birds, which, like Odontopterygiformes, have gliding flight, also show direction of the fibers closer to longitudinal, while birds of comparable size, but with other types of flight, show larger inclination of the fibers to bone axis (larger “laminarity” of the bone) (De Margerie et al., 2005; Simons & O'Connor, 2012). Thus, the direction of fibers and vessels, observed in humeri and femora of Odontopterygiformes, is consistent with what is theoretically expected and observed in other birds with their flight type. However, the interpretation of the direction of bone fibers as an adaptation to the direction of loading is controversial (Lee & Simons, 2015; Warshaw et al., 2017; Pratt et al., 2018; Kuehn et al., 2019).

Most of the examined bones show manifestations of microscopic bioerosion, most often represented by Wedl tunnels. They are thought to be created by fungi or cyanobacteria. Tunnels of atypical morphology are also observed. This

suggests taxonomic diversity of the organisms that created the tunnels. The bioerosion of bones indicates their availability to microorganisms shortly after the death of the animal and carries paleoecological and taphonomic information about the bones and the fossil location.

The scientific novelty of the study. Histological structure of the long bones of Odontopterygiformes and its differences in the two studied species, in their various skeletal elements and in different age stages are described for the first time. Similarity of this structure in general features to the histological structure of the bones of modern Neognathae was shown. Bone microstructure indicates rapid (within a year) growth of large Odontopterygiformes, which does not confirm previous estimates and removes restrictions on feeding these birds with squid. It was found that the direction of fibers in the long bones of Odontopterygiformes corresponds to that expected in birds with their type of flight and observed in their modern ecological counterparts. Manifestations of microscopic bioerosion from the location of Ikove are described for the first time.

Practical value of the study. The obtained results can be used in the identification of fragmentary finds of birds and in the teaching of paleontology courses. A technique for production of thin sections from hard objects is proposed, which does not require hard-to-reach means and is designed to obtain sections well suited for polarizing microscopy and long-term storage. Equipment for serial slicing of solid objects has been designed, as well as equipment for polarization microscopy and photography of microslides, which is suitable for work on non-specialized microscopes with non-specialized lenses and makes it possible to take photos in different lighting conditions without turning the object. Software was written for processing the photos starting from the stage of raw data from the photo matrix.

Keywords: birds, Odontopterygiformes, paleohistology, osteohistology, growth rate, life history, bioerosion, Paleogene, Eocene.

