

Aus dem Department für Kleintiere und Pferde
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentsprecher: O. Univ. Prof. Dr. med. vet. Tzt. Johann Thalhammer)
Fach: Augenheilkunde

INVESTIGATIONS ON THE CONJUNCTIVAL GOBLET CELLS AND THE
CHARACTERISTICS OF THE GLANDS ASSOCIATED WITH THE EYE
IN CHINCHILLAS (CHINCHILLA LANIGER)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Würde eines

DOCTOR MEDICINAE VETERINARIAE

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von

Tierärztin Susanne Voigt

Wien, im Dezember 2011

Begutachter:

Prof. Dr. Monika Egerbacher
Department für Pathobiologie
Institut für Anatomie, Histologie und Embryologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

Betreuer:

Prof. Dr. Barbara Nell
Department für Kleintiere und Pferde
Klinik für Chirurgie und Augenheilkunde
Veterinärmedizinische Universität Wien

Zusätzliche Betreuerin:

Ass. Prof. Dr. Andrea Fuchs-Baumgartinger
Department für Pathobiologie
Institut für Pathologie und Gerichtliche Veterinärmedizin
Veterinärmedizinische Universität Wien

“Success is going from failure to failure without losing enthusiasm.”

Winston Churchill

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Barbara Nell für die Überlassung des Themas sowie für die hervorragende Betreuung und die kritische Durchsicht meiner Arbeit.

Ich danke Frau Karin Fragner vom Institut für Pathologie für ihre kompetente Hilfe und Geduld bei allen technischen Fragen, die während der Probenbearbeitung auftraten.

Ein großes Dankeschön an dieser Stelle auch an Herrn Klaus Bittermann und Frau Manuela Russ für die Hilfe bei der Bearbeitung der Fotos und bei der Erstellung von Grafiken mit Adobe-Photoshop® sowie an Matthias Kirchner für die Rettung verloren geglaubter "Panoramabilder".

Ebenfalls möchte ich Herrn Thomas Blechinger danken. Ohne seine hilfreichen "EDV-Sofortmaßnahmen" wäre diese Arbeit wohl bereits in ihren Anfängen für immer in den Tiefen meines Laptops verschwunden.

Meinem Kollegen James Rushton danke ich ganz besonders für seine großartige Hilfe und Geduld beim Korrektur lesen des Manuskripts.

Ein dickes Dankeschön geht an all meine Freunde, die mich trotz der Entfernung nicht vergessen haben.

Insbesondere danke ich meiner besten Freundin Maren Lesser. Ohne ihre Unterstützung durch alle Hochs und Tiefs der vergangenen 12 Jahre hätte ich das Alles sicher nicht geschafft.

Meinem Freund Torsten Jahn danke ich für seine liebevolle Unterstützung und seine charmante Art v.a. während der stressigen Dissertationsendphase.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern (Erhard und Brigitte Voigt) und meinem Bruder (Andreas Voigt) bedanken. Seit dem Beginn meines Studiums haben sie mich immer auf meinem Weg uneingeschränkt unterstützt und an mich geglaubt. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit wohl nie entstanden.

Diese Arbeit wurde mit dem Titel **“Investigations on the conjunctival goblet cells and the characteristics of the glands associated with the eye in chinchillas (Chinchilla Laniger)”** beim Veterinary Ophthalmology zur Veröffentlichung eingereicht und akzeptiert.

Die Inaugural-Dissertation setzt sich aus einer Einleitung und der zur Publikation eingereichten Originalarbeit und zusammen. Abbildungen und Tabellen befinden sich im Anschluss an das Manuskript.

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung und Literaturübersicht	1
2. Manuskript	6
“Investigations on the conjunctival goblet cells and the characteristics of the glands associated with the eye in chinchillas (Chinchilla Laniger)”	
3. Zusammenfassung	46
4. Summary	47
5. Literaturverzeichnis	48

1. Einleitung und Literaturübersicht

Chinchillas sind dämmerungsaktive Nagetiere, die ursprünglich aus den Anden Südamerikas stammen. Sie zählen zur Ordnung der Nagetiere. Unter Berücksichtigung der drei Hauptmerkmale von Masseter- und Jochbogenbau können 3 traditionelle Unterordnungen der Nagetiere unterschieden werden: die Mäuseverwandten (Myomorpha, z.B. Ratten, Mäuse, Hamster, Gerbil), die Hörnchenverwandten (Sciuromorpha, z.B. Murmeltiere) und die Stachelschweinverwandten (Hystricomorpha, z.B. Chinchillas, Meerschweinchen, Degus). (GRZIMEK et al., 2003; STORCH u. THENIUS, 1988)

Mäuse, Hamster und Meerschweinchen sind seit vielen Jahren bevorzugte Haustiere und auch Chinchillas erfreuen sich zunehmend dieser Beliebtheit und sind daher immer häufiger Patienten in der Kleintierpraxis. Deshalb ist es wichtig, nicht nur ihr Verhalten und ihre Fütterungsgewohnheiten zu kennen, sondern auch die anatomischen Merkmale. Gute anatomische Grundkenntnisse können helfen, Krankheiten vorzubeugen, frühzeitig zu erkennen bzw. zu therapieren.

Bisher gibt es nur sehr wenige Studien über das Chinchillaauge. DETWILER (1949) untersuchte die Morphologie des Chinchillaauges bei 11 Tieren und PEIFFER u. JOHNSTON (1980) beschreiben die Befunde der Augenuntersuchung bei 14 ausgewachsenen Chinchillas. Das Vorhandensein von 2 Tränenpunkten im medialen Kanthus, die nach einer kurzen Strecke in den Tränenkanal münden, wird von CROSSLEY u. ROXBURGH (1999) beschrieben. Der knöcherne Anteil des Tränenkanals verläuft entlang der Zahnwurzeln der rostralen Backenzähne und der Inzisivi und mündet dann direkt auf der Innenseite der Nasenlöcher in die Nasenhöhle. LIMA et al. (2011) beschreiben ebenfalls die Morphologie des Chinchillaauges und erstellen Referenzwerte für ausgewählte ophthalmologische Tests (Bestimmung Lidspaltenlänge, Schirmer Tränentest, Augeninnendruck, zentrale Hornhautdicke) und auch MÜLLER et al. (2011) erhoben Referenzwerte für den Schirmer Tränentest, den Phenolrot Fadentest, den Augeninnendruck und die Hornhautsensitivität beim Chinchilla. Bisher gibt es jedoch noch keine Informationen über die Drüsen am Auge des Chinchillas.

Mit Hilfe der erstmaligen Beschreibung der Anatomie und Histologie der Drüsen am Auge des Chinchillas sowie durch die Erstellung eines konjunktivalen Becherzellindex soll der Weg für zukünftige Studien, die sich mit der Zusammensetzung des Tränenfilmes beim Chinchilla beschäftigen, geebnet werden.

Infolge der engen taxonomischen Beziehung des Chinchillas zum Meerschweinchen und ferner auch zu Maus, Ratte, Hamster, Degu und Gerbil wurden die Ergebnisse der Studie mit diesen Tierarten verglichen.

Meibomsche Drüsen sind Talgdrüsen, die sich entlang der Augenlider erstrecken. Sie stehen, im Gegensatz zu den Zeis Drüsen, nicht in Beziehung zu Haaren. Ihre Anzahl und Gestalt variiert bei den verschiedenen Nagetieren.

Bei Meerschweinchen, Ratte, Maus und Hamster wurden Meibomsche Drüsen entlang des Ober- und Unterlides gefunden. (GASSER, 2011; KITTEL, 1962; QUAY, 1954)

Während KITTEL (1962) eine ampullenartige Erweiterung der Meibomschen Drüsenpakete am temporalen Kanthus beschreibt, ist diese Aussage bei GASSER et al. (2011) nicht zu finden. Vielmehr beschreiben GASSER et al. (2011) das Vorhandensein temporaler subkonjunktivaler Talgdrüsen, die jedoch nicht in Verbindung mit den

Meibomschen Drüsen stehen. Die Öffnungen der Meibomschen Drüsen befinden sich am Lidrand am Übergang der äußeren Haut zur Lidbindehaut und sind beim Meerschweinchen in der Regel makroskopisch oder mit Hilfe des Spaltlampenbiomikroskops zu sehen (GASSER et al., 2011). Ihre Anzahl variiert je nach Literatur zwischen jeweils 25 Öffnungen im Ober- und Unterlid (KITTEL, 1962) und $27,1 \pm 3,0$ Öffnungen im Ober- und $25,7 \pm 2,3$ Öffnungen im Unterlid (GASSER et al., 2011). Bei Hamster, Ratte und Maus wurde ebenfalls eine temporale Erweiterung der Meibomschen Drüsenpakete gesehen. Zehn bis zwölf Einzeldrüsen pro Ober- und Unterlid wurden beschrieben (KITTEL, 1962).

Zeis Drüsen sind Talgdrüsen, die beim Meerschweinchen in Transversalschnitten der Lider gefunden worden sind. Sie stehen immer in Verbindung mit Haarfollikeln, in welche der Ausführungsgang der Zeis Drüse mündet. Ihre histologische Struktur ist identisch mit den Meibomschen Drüsen (GASSER et al., 2011).

Die **Bindehaut (Konjunktiva)** erstreckt sich entlang der Innenseite der Augenlider, bildet einen Bindehautsack (Fornix oder lymphonoduläre Zone) im Ober- und Unterlid und überzieht dann die Sklera bis zum Übergang der Sklera in die Hornhaut. Sie kann, je nach Nagetierspezies, in 3 bis 6 Zonen (Abschnitte) unterteilt werden (GASSER et al., 2011; DWYER et al., 1983; GASSER et al., 2011; HUANG et al., 1988; LATKOVIC u. NILSSON, 1979 a, b; NICHOLS, 1996; SMITH et al., 2002). Die einzelnen Abschnitte unterscheiden sich sowohl in ihrer Lokalisation als auch im histologischen Erscheinungsbild sowie in der jeweiligen Anzahl der Zelllagen. So werden beim Meerschweinchen je nach Zone zwischen 3 und 6 Zelllagen eines mehrschichtigen, unverhornten Epithels (BÖCK u. HANAK, 1971; GASSER et al., 2011; LATKOVIC, 1979 a, b; LATKOVIC u. NILSSON, 1979 a, b; NICHOLS, 1996), bei der Ratte zwischen 5 und 7- (SETZER et al., 1987) und bei der Maus zwischen 2 und 7 Zelllagen (SMITH et al., 2002) unterschieden. Neben basalen, intermediären und oberflächlichen Epithelzellen besitzt die Konjunktiva auch Melanozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Becherzellen.

Die konjunktivalen Becherzellen, die ihren Namen ihrer "becherähnlichen" Form verdanken, produzieren Muzine (saure und neutrale Mukopolysaccharide) und bilden somit die Muzinschicht des Tränenfilms. Neutrale Mukopolysaccharide färben sich positiv mit Perjodsäure und Schiff'schem Reagenz (PAS). Saure Mukopolysaccharide sind mit Alcian Blau (AB) anfärbbar (BÖCK, 1989). Je nach Nagetierspezies erscheinen die konjunktivalen Becherzellen in der Bindehaut einzeln (GASSER et al., 2011; LATKOVIC, 1979 a, b; LATKOVIC u. NILSSON, 1979 a, b; MICALI et al., 1998; NICHOLS, 1996) oder in Gruppen (HUANG et al., 1988; MICALI et al., 1998; SETZER et al., 1987). Ihre Dichte und Verteilung ist in den einzelnen Bindehautzonen unterschiedlich. In früheren Studien beim Meerschweinchen wurde die Becherzellendichte im Bereich der Bindehautsäcke (Fornices) als mäßig bis hoch (ASTLEY et al., 2007; LATKOVIC, 1979 a; NICHOLS, 1996) und im Bereich der bulbären und limbalen Bindehaut als gering angegeben (GASSER et al., 2011; LATKOVIC, 1979 a; LATKOVIC u. NILSSON, 1979 a, b; NICHOLS, 1996). Eine quantitative Studie über die Becherzellverteilung in der Konjunktiva beim Meerschweinchen ergab die größte Becherzellendichte (13.7–16.4%) im Bereich der palpebralen und bulbären Bindehaut und die geringste Becherzellendichte (0.0–1.0%) in der limbalen Konjunktiva (GASSER et al., 2011). Bei der Maus und bei der Ratte wurde die höchste Becherzellendichte im Bindehautfornix (HUANG et al., 1988; SMITH et al., 2002) und die geringste

Becherzelllichte im Bereich der bulbären und tarsalen (palpebralen) Bindehaut beschrieben (HUANG et al., 1988).

Im Bereich des Bindehautsackes (Fornix; lymphonoduläre Zone) kann eine Ansammlung von Lymphozyten in Form kleinerer Lymphfollikel gefunden werden. Diese Ansammlungen lymphozytärer Zellen sind physiologisch beim Meerschweinchen (DWYER et al., 1983, GASSER et al., 2011; LATKOVIC, 1979 a, b; LATKOVIC u. NILSSON, 1979 a, b), jedoch konnten sie weder in der Bindehaut bei Sprague-Dawley Ratten (SETZER et al., 1987) noch bei Wistar Ratten (CHODOSH et al., 1998) und in Wildpopulationen von Hausmäusen (ASTLEY et al., 2007) gesehen werden.

Die **Harder(sche) Drüse** ist die prominenteste Drüse in der Orbita der o.g. Nagetiere. Sie ist im Bereich des kaudalen Poles des Augapfels lokalisiert und erstreckt sich entlang des Bulbus nach nasal. Ihre Größe entspricht beim Meerschweinchen ca. der Hälfte bis 2/3 des Bulbusumfanges (GASSER et al., 2011), bei der Ratte 7/8 des Augapfelumfanges (VENABLE u. GRAFFIN, 1990) und bei der Maus ist die Länge der Harderschen Drüse mit 0,7-0,9 cm angegeben (COHN, 1955; WOODHOUSE u. RHODIN, 1963). Die Hardersche Drüse ist hufeisenförmig bei Ratte, Maus und Hamster (COHN, 1955; KITTEL, 1962; PAYNE et al., 1992; WOODHOUSE u. RHODIN, 1963) und halbmondförmig beim Gerbil (JOHNSTON et al., 1983). Makroskopisch erscheint die Drüse bei den einzelnen Nagetierspezies unterschiedlich stark gelappt (COHN, 1955; GASSER et al., 2011; GEASE u. SATOH, 2001; VENABLE u. GRAFFIN, 1990; WOODHOUSE u. RHODIN, 1963). Ebenfalls ist die Farbe der Harderschen Drüse bei den verschiedenen Nagetieren unterschiedlich, z.B. weisslich bis pink beim Meerschweinchen (GASSER et al., 2011), pink mit dunklen Pigmentpartikeln bei der Maus (COHN, 1955), grau (WOODHOUSE u. RHODIN, 1963) oder dunkel-grau bis schwarz-braun (JOHNSTON et al., 1983; SAKAI u. YOHRO, 1981) beim Gerbil. Histologisch ist die Hardersche Drüse eine tubuloalveoläre Drüse, welche von einer dünnen Kapsel aus Bindegewebe umschlossen ist. Feine Septen ziehen von der Kapsel ausgehend ins Drüseninnere und teilen die Hardersche Drüse in Läppchen. Jedes Drüsenläppchen besteht aus einer Vielzahl von Tubuli und Alveoli, die ein weites Lumen besitzen. Eine variable Anzahl sekretorischer Zellen wird bei den einzelnen Nagetieren unterschieden. So besitzt das Meerschweinchen nur einen sekretorischen Zelltyp (BUSCHKE, 1933; ORTIZ et al., 2001), Ratte und Maus je 2 sekretorische Zelltypen (DJERIDANE, 1994; MÜLLER, 1969; ORTIZ et al., 2001; STRUM u. SHEAR, 1982; WOODHOUSE u. RHODIN, 1963) und der Gerbil 1 bis 3 Zelltypen (DJERIDANE, 1996, 1992). Hamster zeigen eine geschlechtsspezifische Anzahl. Die weiblichen Tiere besitzen 1 Zelltyp und die Männlichen zwei (BUCANA u. NADAKAVUKAREN, 1973; BUZZELL, 1996; LOPEZ et al., 1996, ORTIZ et al., 2001). Das Zytoplasma der Drüsenzellen ist mit Vesikeln unterschiedlicher Größe gefüllt. Diese Vesikel enthalten Lipide (ANTOLIN-GONZALES et al., 1993; BUZZELL, 1996; COHN, 1955; DJERIDANE, 1992, 1994, 1996; GASSER et al., 2011; PAYNE et al., 1992; SABRY et al., 2000; SAKAI u. YOHRO, 1981; STRUM u. SHEAR, 1982; WOODHOUSE u. RHODIN, 1963). In lichtmikroskopischen Untersuchungen bei Meerschweinchen, Ratte, Maus, Hamster, Gerbil und Octodon Degus wurden Myoepithelzellen zwischen den Drüsenzellen und der Basalmembran gefunden (ANTOLIN-GONZALES et al., 1993; BUCANA u. NADAKAVUKAREN, 1972; DJERIDANE, 1994; MÜLLER, 1969; ORTIZ et al., 2001; STRUM u. SHEAR, 1982; WATANABE, 1980; WOODHOUSE u. RHODIN, 1963). Beim Gerbil jedoch sind diese Strukturen nur elektronenmikroskopisch zu sehen (DJERIDANE, 1992, 1996; JOHNSTON et al., 1983; ORTIZ et al., 2001; SABRY et al., 2000; SAKAI u. YOHRO, 1981).

Während in früheren Studien keine intralobulären Drüsengänge beim Meerschweinchen gefunden wurden (LÖWENTHAL, 1896), zeigt eine neuere Studie das Vorhandensein von intra- und interlobulären Drüsengängen (GASSER et al., 2011). Diese sind entweder von einem einschichtigen kubischen Epithel (kleinere Gänge) oder von einem mehrschichtigen kubischen Epithel (größere Gänge) begrenzt (GASSER et al., 2011). Die Lokalisation der Öffnung des Ausführungsganges variiert je nach Studie. KITTEL (1962) beschreibt die Öffnungen mehrerer Ausführungsgänge im nasalen Augenwinkel auf der Innenseite des 3. Augenlides. KAMOCKI (1883) lokalisiert die feine Mündung eines Ausführungsganges auf der Innenseite der rudimentären Nickhaut und LÖWENTHAL (1892) fand die Öffnung des, von lymphatischem Gewebe umgebenen, Ausführungsganges, auf der Außenseite des zurückgebildeten dritten Augenlides. Auch die Ratte (KITTEL, 1962), mit Ausnahme der Diabetischen Sandratte (DJERIDANE, 2002), besitzt intra- und extralobuläre Drüsengänge. Die Mündung des Drüsenausführungsganges befindet sich bei dieser Spezies auf der konkaven Fläche der Nickhaut, ähnlich wie bei der Maus (COHN, 1955; DJERIDANE, 1994; KITTEL, 1962; STRUM u. SHEAR, 1982), wo jedoch die Drüsengänge nur sehr selten zu sehen sind. Beim Hamster und Gerbil wurde bisher kein eindeutiges Gangsystem beobachtet. Die Mündung des Ausführungsganges befindet sich beim Hamster auf der Innenseite der Nickhaut und beim Gerbil nasal und ventral des dritten Augenlides (GESASE u. SATOH, 2001; SAKAI u. YOHRO, 1981).

In früheren Studien wurde die **Tränendrüse** bei Meerschweinchen, Maus, Ratte und Hamster in 2 Anteile unterteilt. Je nach ihrer anatomischen Lokalisation wurde eine Glandula infraorbitalis oder - intraorbitalis und eine Glandula extraorbitalis oder - exorbitalis unterschieden (KITTEL, 1962; LORBER, 1993; LÖWENTHAL, 1900). Die Tränendrüse beim Meerschweinchen wird von COOPER u. SCHILLER (1975) als graue und halbmondförmig Drüse beschrieben, die sich im kaudalen und ventralen Teil des Orbitarandes befindet. Kaudodorsal ist die Drüse fest mit dem Periost der Orbita verbunden und anterioventral mit dem Periost des Jochbogens. Auch WALDE und NELL (2008) beschreiben die Lokalisation der Tränendrüse im ventrolateralen Teil der Orbita mit einer festen Verbindung zum orbitalen Periost. Nasal wird die Tränendrüse vom Jochbogen überzogen. KITTEL (1962) charakterisiert die Glandula orbitalis externa als kleine ovale Drüse am Vorderrand der Ohrmuschelbasis. Die Glandula infraorbitalis zeigt die Form eines ungleichseitigen Dreiecks. Die Basis verläuft entlang des ventrokaudalen Orbitarandes, die Spitze reicht bis an die Glandula orbitalis externa heran und ein Drüsenschinkel schiebt sich zwischen den Temporalismuskeln und dem Jochbogen. In einer neueren Studie von GASSER et al. (2011) kann eine extraorbitale Tränendrüse im Bereich der Ohrmuschelbasis nicht gefunden werden. Die Tränendrüse zeigt eine dreieckige Form und ist erst nach Durchtrennung des Ligamentum orbitale in ganzer Ausdehnung sichtbar. Der Hauptteil des Drüsenkörpers befindet sich temporoventral, der Außenfläche des Jochbeines anliegend. Ein Drüsenausläufer erstreckt sich temporal und ein Drüsenanteil verläuft nasal entlang der Innenfläche des Jochbeines, ohne jedoch den nasalen Kanthus zu erreichen. Insgesamt entspricht die Länge der Tränendrüse der Länge eines Augenlides. Bei der Maus, Ratte und Hamster wird die Lage der extraorbitalen Tränendrüse gleich wie beim Meerschweinchen im Bereich der Ohrmuschelbasis angegeben. Die relativ kleine infraorbitale Tränendrüse der Maus befindet sich im kaudalen Augenwinkel, zwischen dem Jochbein und dem Temporalismuskel (KITTEL, 1962). Die infraorbitale Tränendrüse der Ratte ist ebenfalls von dreieckiger Form, deren Basis sich ventrokaudal dem Orbitarand annähert. Sie ist im Gegensatz zur Maus relativ groß. Auch die Glandula infraorbitalis des Hamsters hat die Form eines

gleichschenkligen Dreiecks, dessen Spitze ohrwärts gerichtet ist. Der ventrale Drüsenschankel wird durch das Jochbein begrenzt. Die Längenausdehnung dieser Drüse wird mit 0,8-0,9 cm angegeben. (KITTEL, 1962).

Die Farbe der Tränendrüse ist tierartlich unterschiedlich. Während bei Maus und Hamster über die Farbe keine Angaben zu finden sind, wird die Tränendrüse des Meerschweinchens als grau (COOPER u. SCHILLER, 1975) oder leicht pink bis hellbraun (GASSER et al., 2011) und die Tränendrüse der Ratte als gelblich-bräunlich beschrieben (LÖWENTHAL, 1895).

Histologisch betrachtet ist die Tränendrüse des Meerschweinchens von einer dünnen bindegewebigen Kapsel umgeben. Von der Kapsel ausgehende feine Septen unterteilen die Tränendrüse in Läppchen. (GASSER et al., 2011; KROCHMALSKA, 1976). Die Histologie der Tränendrüse des Meerschweinchens (GASSER et al., 2011; KITTEL, 1962; LÖWENTHAL, 1895) und der Ratte (LÖWENTHAL, 1895) ist erstmalig durch Löwenthal beschrieben worden. Die Drüse zeigt einen tubuloazinösen Charakter. Die Drüsenazini besitzen sehr enge Lumina und das Zytoplasma der Drüsenzellen erscheint granuliert. Auch KITTEL (1962) bestätigt die Ausführungen Löwenthals und erwähnt noch zusätzlich, dass die Glandula exorbitalis beim Meerschweinchen eine ähnliche histologische Struktur zeigt. WALDE u. NELL (2008) berichten von engen Lumina der Drüsenazini beim Meerschweinchen. Ebenfalls beschreiben WALDE u. NELL (2008) wie auch KROCHMALSKA (1976) und GASSER et al. (2011) das Vorkommen von intra- und interlobulären Drüsengängen beim Meerschweinchen.

Erstmalig unterscheiden GASSER et al. (2011) aufgrund des Färbeverhaltens mit Perjodsäure und Schiff'schem Reagenz (PAS) und Alcian Blau (AB) drei verschiedene Zelltypen beim Meerschweinchen. Typ 1 Zellen erscheinen vakuolisiert. Ihr Zytoplasma ist mit großen Vesikeln gefüllt und das Lumen der Typ 1 Azini ist eng. Dieser Zelltyp ist vorrangig in der Peripherie der Tränendrüse zu sehen. Typ 1 Zellen färben sich weder mit PAS noch mit AB. Typ 2 Zellen sind in der Regel zwischen Typ 3 Zellen und der Drüsenoberfläche zu beobachten. Ihr Zytoplasma erscheint im Gegensatz zu den Typ 1 Zellen fein granuliert. Dieser Zelltyp färbt sich entweder ganz leicht mit PAS und AB oder gar nicht. Der dritte Zelltyp (Typ 3) ist durch ein homogenes Erscheinungsbild des Zytoplasmas charakterisiert. Nur ganz feine Granula, gefüllt mit eosinophilem Material sind im Zytoplasma zu sehen. Die Zellen zeigen ein insgesamt "geschwollenes" Bild und ein Lumen der Azini ist nur schwer zu erkennen. Typ 3 Zellen färben sich hauptsächlich mit PAS, nur einige Azini vom Typ 3 färben sich zusätzlich noch mit AB. Dieser Zelltyp erscheint in erster Linie in der Umgebung der Ausführungsgänge und im Zentrum der Drüse.

Die Glandula infraorbitalis und - orbitalis externa des Hamsters sind weitestgehend gleich gebaut. Die Azini zeigen ein enges Lumen und das Zytoplasma der Drüsenzellen ist fein granuliert. Intra- und extraglanduläre Ausführungsgänge zeigen einen identischen Aufbau (KITTEL, 1962).

Die Glandula infraorbitalis bei der Ratte zeigt 2 verschiedene Anteile (KITTEL, 1962; LÖWENTHAL, 1895). Es werden Azini mit weiten und engen Lumina unterschieden. Das histologische Bild variiert nach Alter und Geschlecht (KITTEL, 1962).

2. Manuskript

“Investigations on the conjunctival goblet cells and the characteristics of the glands associated with the eye in chinchillas (*Chinchilla Laniger*)”

Eingereicht im *Veterinary Ophthalmology* im September 2011, akzeptiert im Dezember 2011 (Bestätigung liegt als Anhang der Publikation bei). Tabellen und Abbildungen befinden sich am Ende des Manuskripts.

Investigations on the conjunctival goblet cells and the characteristics of the glands associated with the eye in chinchillas (*Chinchilla Laniger*)

Susanne Voigt,¹ Andrea Fuchs-Baumgartinger,² Monika Egerbacher,² Alexander Tichy,³
Barbara Nell¹

¹ Department for Companion Animals and Horses, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinaerplatz 1, 1210 Vienna, Austria; ² Department for Pathobiology, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinaerplatz 1, 1210 Vienna, Austria; ³ Department for Biomedical Sciences, University of Veterinary Medicine Vienna, Veterinaerplatz 1, 1210 Vienna, Austria

Address communications to:

Susanne Voigt

Tel.: +43 1 250776635

Fax: +43 1 250775390

e-mail: susanne.voigt@vetmeduni.ac.at

susannevoigt81@web.de

Abstract

Objective To investigate the density and distribution of conjunctival goblet cells (GC) and study the anatomy and microscopic characteristics of glands associated with the eye in chinchillas (*Chinchilla Laniger*).

Procedure 12 chinchillas were included in the study. Conjunctiva (divided into 4 regions), eyelids and glands were embedded in paraffin wax, sectioned, stained and analysed.

Results Highest GC densities were found in the palpebral region of the nasal and temporal conjunctiva of both eyelids (GC index: 25.1-18.2%) and lowest densities in the bulbar and marginal region of the nasal and temporal conjunctiva of both eyelids (GC index: 1.5-0.0%). Meibomian glands extend along the entire length of both eyelids and the whole glandular complex broadens towards the temporal canthus. This is macroscopically visible through the conjunctiva. The openings of the Meibomian glands are macroscopically not discernible. The light pink, smooth and crescent-shaped lacrimal gland lies next to the aforementioned broadened part of the Meibomian glands in the temporal canthus. The whitish, 0.9 cm long, smooth Harderian gland is firmly attached to the posterior part of the globe and extends nasally from the optic nerve to the equator. Furthermore, chinchillas possess two lacrimal puncta, situated on the inner conjunctival surface of both eyelids near the medial canthus. A pigmented lacrimal canaliculus originates from each punctum. The vestigial nictitating membrane is supported by a hyaline cartilage and is pigmented at its free margin.

Conclusions Chinchillas possess a Harderian gland, a lacrimal gland and Meibomian glands. The GC density in the nasal and temporal palpebral conjunctiva is higher than in guinea pigs.

Key Words: *Chinchilla Laniger*, goblet cells, Harderian gland, lacrimal gland, Meibomian gland

INTRODUCTION

Chinchillas are crepuscular mammals which originate from the Andes Mountains in South America. They belong to the order rodentia. Several taxonomic classifications exist. Based on their zygomasseteric morphologies (origin and insertion of jaw muscles and differences of the skull associated with this musculature) rodents can be classified into 3 suborders:

Hystricomorpha (e.g. degus, guinea pigs and chinchillas), Myomorpha (e.g. rats, mice, hamsters and gerbils) and Sciumorpha (e.g. marmots).^{1,2}

Chinchillas are becoming more and more popular as pets in Austria and Germany and are therefore presented at veterinary practice.

Up to the present day only little information on the anatomy of chinchilla eyes and their adnexa is available.^{3,4,5} Chinchillas have low Schirmer tear tests and low blinking frequencies; this information is based on the results of two studies.^{6,7} On slit lamp examination no openings of the Meibomian glands are detectable, hence little information is known about the structures contributing to the tear film.

The purpose of the study was to investigate the anatomy and histology of the glands involved in the tear film production in order to classify the glands according to their function and to determine reference values for goblet cell densities in chinchillas.

Due to the close taxonomical relationship to guinea pigs, the results were primarily compared with results from studies on guinea pigs, followed by rats, mice, hamsters, gerbils and degus.

MATERIAL AND METHODS

The eyes and their adnexa from 12 chinchillas (*Chinchilla Laniger*), euthanized for reasons unrelated to this study were used. The entire heads were fixed in 10 % buffered formaldehyde within 2 hours after euthanasia. Ophthalmic examination prior to euthanasia was not performed since the animals were already dead at the time the sample material was collected. All eyelids were examined using a handheld biomicroscope (Kowa SL-14, Kowa Company Ltd., Tokyo, Japan) in order to identify the Meibomian gland openings. Afterwards, 21 eyes and adnexa were dissected under microscopic magnification (Operationsmikroskop Opmi[®] CS-I; Zeiss; Oberkochen, Austria). The lid margins with adjacent conjunctiva, conjunctival sac and eyeball were completely removed. Care was taken not to stretch or damage any tissue. The globe was transected transversally approximately 3 mm behind the limbus. Eyelids and conjunctiva were divided into an upper and a lower half by cutting the cornea horizontally. Each half was placed on a sheet of cardboard, put into a cassette and immersed into 10 % buffered formaldehyde. Afterwards the fixed halves were further divided into a nasal and a temporal part by removing an approximately 2 mm central strip. Dehydration was accomplished by a vacuum infiltration processor (Tissue-TEK VIP III, Miles Scientific). Thereafter all samples were embedded into paraffin wax and 2 μ m sections were transversally cut using a rotary microtome (Microm HM 360-rotary microtome). Sections were mounted on glass slides, stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) and Periodic Acid Schiff's reaction (PAS). Each staining was performed according to a staining-protocol for paraffin sections.⁸ In one eye both eyelids with conjunctivae were cut horizontally to achieve a better view of the extent of the Meibomian glands.

The goblet cell density was defined by the goblet cell index (GCI). To determine the topographic distribution and density of conjunctival goblet cells, conjunctiva from the eyelid to the cornea was divided into four different zones according to their characteristic

histological appearance. Pictures of the sections were taken with an Olympus DP 50 camera and merged to panoramas by Adobe-Photoshop[®] CS3-Extended (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA). Goblet cell indices (GCI) were determined by counting goblet cells per 200 epithelial cells for each area in 2 µm PAS stained sections. Four-hundred epithelial cells were counted in the bulbar area since this area is approximately twice the size of the palpebral area. In areas containing less than 200 cells (or less than 400 cells in the bulbar area), all cells were counted. Goblet cell indices (GCI) were determined for each sampling site. All nuclei, visible in the conjunctival epithelium were counted. Eight areas per eyelid and 16 per eye were analysed separately. Damaged or non-analysable conjunctival areas were excluded from the study. Each region received a special identification code, which included the examined eyelid, sampling site and area. For instance, LL N P stands for palpebral (P) area of the nasal (N) lower eyelid (LL). Nevertheless, whenever the quality of the sections made it possible, a total of 1000 cell nuclei (3 x 200; 1x 400) per sample were counted.

The Harderian glands and lacrimal glands from 5 chinchillas were carefully dissected. Each sample was fixed in 10 % buffered formaldehyde, dehydrated and embedded in the aforementioned manner. Two-micrometer sections were cut horizontally. The slices were mounted on glass slides and each separately stained with H&E, PAS and Alcian Blue (AB). PAS stains neutral mucosubstances with glycol-groups and glycogen. Periodic Acid Schiff (PAS) positive structures appear pink to purple.⁸ Alcian Blue (AB) was used for detection of acid mucosubstances. As in the study by Gasser et al., we used AB at a pH of 2.5.⁹ Acid mucosubstances appear bright blue and nuclei stain light red.⁸ Each sample was examined by one person using a standard light microscope at x4, x10, x20 and x40 magnification.

During the dissection procedure, a vestigial nictitating membrane and two lacrimal puncta were found. These structures were embedded, sectioned and stained in a similar manner to the conjunctiva.

Statistical analysis was performed using SPSS v17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Differences in goblet cell densities between the upper and lower eyelid, nasal and temporal part and amongst the four different conjunctival zones were analysed using an ANOVA model for repeated measure. *Post hoc* analysis was applied using least significant difference (LSD) procedures. A *P*-value of < 0.05 was considered significant in all tests. Differences in goblet cell densities from the various conjunctival zones between chinchillas and guinea pigs were analysed using *t*-tests.

RESULTS

Sebaceous glands

Meibomian glands

The slightly whitish Meibomian glands were found along the entire length of both eyelids in a symmetrical pattern. The whole glandular complex broadens towards the temporal canthus.

The temporal broadened glandular complex is macroscopically visible through the conjunctiva. (Fig. 1) The openings of the excretory ducts are not discernible along the lid margin at x16 magnification using a handheld biomicroscope.

Meibomian glands are embedded into connective tissue and muscle fibres. Their acini appear honeycomb-like and loosely arranged in a row. The cytoplasm of the acini cells is filled with a homogenous eosinophilic material and the round nuclei are located centrally. The excretory ducts reveal wide lumina and are lined with a mostly double-layered epithelium which turns into a multi-layered squamous epithelium towards the openings of the ducts and contains some melanocytes. The ducts extend from the distal glandular part and emerge on the conjunctival side of the lid margin. (Fig. 2) Meibomian glands did not react positive with PAS.

Glands of Zeis

These sebaceous glands are associated with hair follicles. The glandular structure is similar to Meibomian glands. Fewer acini are arranged in a row, in comparison to Meibomian glands. Their short excretory duct opens directly into the hair follicle. (Fig. 3) Glands of Zeis did not stain positive with PAS either.

Conjunctiva and goblet cells

Based on the histological appearance, the conjunctiva was divided into 4 different zones:

- (1) Marginal area: begins where the multilayered keratinized epithelium of the lid skin turns into a 3 to 4-layered cuboidal conjunctival epithelium. This zone is characterized by the presence of melanocytes. (Fig. 4a)
- (2) Palpebral area: is directly adjacent to the marginal zone, no melanocytes were found. This zone is marked by mostly 2 to 3-layered cuboidal to columnar epithelium, which is folded and contains several goblet cells. The superficial cell layer consists of low-cuboidal epithelial cells. (Fig. 4b)
- (3) Lymphonodular area: is located approximately half way between the marginal and bulbar area of the conjunctiva, directly adjacent to the palpebral zone. A cuboidal to flat epithelium covers the lymphatic nodules. In some sections poorly delineated lymphatic nodules were recognized. Only few scattered lymphocytes were found beneath the epithelium. None or few goblet cells were discernible. (Fig. 4c)
- (4) Bulbar area: is defined as the distance between the lymphonodular area and cornea. The epithelium is mostly double-layered, columnar to cuboidal with no or only few goblet cells. (Fig. 4d)

Conjunctival goblet cells are characterized by a PAS positive staining pattern within the conjunctival epithelium. A basement membrane, directly adjacent to the conjunctival

epithelium, is seldom discernible. The underlying subconjunctival tissue contains blood vessels, nerves, fibroblasts and fibrocytes as well as small lymphatic vessels. The lymphatic nodules, located in the subconjunctival tissue, approximately half the distance between the lid margin and cornea are most prominent. However, in some slides only small aggregations of lymphocytes or few or no lymphocytes were seen. In sections where the lymphonodular area was missing or not clearly identifiable, the area was excluded from analysis. In most cases, the overlying conjunctival epithelium was interspersed with single lymphocytes, however goblet cells were rarely detectable in this area.

Goblet cell densities and distribution are illustrated in Table 1 and Figure 5 and 6.

Highest goblet cell densities were found in the nasal and temporal palpebral conjunctiva in both eyelids (GCI: 25.1-18.2%) whereas lowest densities were seen in the nasal and temporal part of the bulbar and marginal conjunctiva in the upper and lower eyelid (GCI: 1.5-0.0%).

For each region data of left and right eyes were pooled for statistical analysis by repeated measurements ANOVA. The main effects calculated by ANOVA are shown in Table 2.

Statistical analysis of variance (ANOVA) revealed no significant difference between upper and lower eyelid and between eyelid and nasal and temporal part. Significant differences were noted between both nasal and temporal parts and between eyelid and conjunctival zone.

Furthermore, significant differences between all conjunctival zones (marginal, palpebral, lymphonodular, bulbar) and between nasal and temporal part and conjunctival zone were found. *Post hoc* procedures (least significant difference) revealed that the palpebral zone differed significantly from each of the other 3 zones, whereas the marginal, lymphonodular and bulbar zones did not show a significant difference.

Harderian gland

Gross anatomy and topography The Harderian gland in chinchillas is an approximately 0.9 cm long, oval, whitish, smooth and macroscopically non-lobulated gland. It is firmly attached to the posterior part of the globe with its concave surface and extends nasally from the optic nerve to the equator. The convex posterior surface of the gland lies deep within the orbit, embedded by ocular muscles. The Harderian gland is the most prominent gland in the chinchilla orbit. (Fig. 7)

Histology Histologically, the gland is a tubuloalveolar gland, enclosed by a thin capsule of connective tissue. Small strands of this capsule run into the gland and divide it into separate lobules. This small amount of connective tissue contains e.g. small blood vessels and interlobular excretory ducts. The tubuli and alveoli are lined with a single layer of columnar to cuboidal epithelial cells. A lumen of the alveoli and tubuli is clearly discernible (Fig. 8). In H&E stained sections the cytoplasm stains pink and contains vesicles of variable size. Small vesicles are located in the apical part of the cytoplasm whereas the larger vacuoles are situated basally. These vesicles and vacuoles mostly appear empty, due to the absence of positive staining with PAS or AB. Only the cell surface coat (Glycocalyx), stained positive with AB (Fig. 9 a) and PAS (Fig. 9 b). The blue round nuclei of the glandular cells are located basally. Numerous glandular tubules merge into small intralobular ducts which are rarely detectable within the lobes. These ducts are lined with a single layer of cuboidal epithelial cells and surrounded by small amounts of connective tissue. Their nuclei are central. Interlobular ducts may be identified within the small strands of connective tissue between the lobes. They are surrounded by connective tissue and lined with a single to double-layered epithelium, depending on their size. The excretory duct opening was not observed in any of the sections.

Lacrimal gland

Gross anatomy and topography The approximately 0.8 to 1.0 cm long, reddish, smooth and crescent-shaped lacrimal gland lies next to the broadened glandular complex of the Meibomian glands in the temporal canthus. It is firmly attached to the temporal margin of the orbital rim. (Fig. 10)

Histology Light microscopic examination of H&E stained sections revealed a tubuloacinar glandular structure. The gland is covered by a thin connective tissue capsule. Small septa of this capsule divide the gland into lobes and lobules. The gland shows a homogenous cell structure and the acini are lined with a cuboidal glandular epithelium. A lumen of the acini and tubuli is rarely detectable (Fig. 11b). The cytoplasm is finely granulated and stains pink to slightly basophil around the nuclei which are round and basally located. Some acini stain positive for PAS (Fig. 11 a) and AB (Fig. 11 c), but their distribution does not follow a specific pattern. In fact these acini are diffusely distributed throughout the gland. The lacrimal gland possesses intra- and interlobular ducts. (Fig. 11 a) They are surrounded by connective tissue and are lined with single to double-layered cuboidal epithelium with centrally placed nuclei.

Lacrimal puncta

Chinchillas have 2 lacrimal puncta, situated nasally on the conjunctival surface of both eyelids. A pigmented lacrimal canaliculus lined with a stratified epithelium originates from each punctum. (Fig. 12)

Nicitating membrane

A razor-thin vestigial and triangular nictitating membrane is situated in the nasal canthus. It is pigmented at its free margin. (Fig. 13)

Histologically, the third eyelid is lined with a stratified conjunctival epithelium with goblet cells and melanocytes at its free margin. (Fig. 14) Furthermore the nictitating membrane is supported by a hyaline cartilage, extending from the base to the rim. A nictitans gland was not detected. GCI for the third eyelid was not evaluated since only two nictitating membranes from two eyes of two different animals were examined

DISCUSSION

Meibomian glands

Meibomian glands extend equally along the entire length of both eyelids as described in guinea pigs,^{9,10} voles and lemmings,¹¹ hamsters,¹⁰ and mice.¹⁰ In guinea pigs the orifices of the glands are occasionally discernible macroscopically, but always visible using a handheld biomicroscope, not so in the chinchilla.⁹ Therefore, counting the openings of the Meibomian glands as performed in guinea pigs was not possible.^{9,10} In chinchillas, the glandular complexes of the Meibomian glands broaden towards the temporal canthus of both eyelids as mentioned in some subfamilies of microtinae,¹¹ cricetidae,¹⁰ muridae^{10,11} and guinea pigs.¹⁰ These temporally broadened parts were macroscopically visible through the conjunctiva. In contrast, Walde and Nell as well as Gasser et al. did not find the temporal enlarged part in guinea pigs.^{12,9} Rather the existence of paired temporal subconjunctival sebaceous glands was described.^{9,12} We did not find subconjunctival sebaceous glands in chinchillas.

Histologically, the glandular structure is similar to that in guinea pigs.⁹ The openings of the Meibomian glands excretory ducts are histologically clearly discernible at the conjunctival side of the lid margin.

Glands of Zeis.

As in guinea pigs, the glands of Zeis were always associated with hair follicles.⁹

Conjunctiva and goblet cells

Due to its histological appearance the conjunctiva was divided into four zones. Several authors graded the conjunctiva of guinea pigs,¹³⁻¹⁸ rats¹⁹ and mice²⁰ in a different way to ours, however in the study by Gasser et al.⁹ the zoning-system in guinea pigs was reported similar to ours. A limbal zone, defined by the presence of melanocytes within the basal layer of the epithelium, has been described in guinea pigs. This zone is located between the bulbar conjunctiva and cornea.⁹ Due to the lack of melanocytes a limbal zone could not be identified in chinchillas. As in guinea pigs,^{9,13,14} lymphatic nodules are found in nearly all samples in the lymphonodular zone, which is equivalent to the fornix. In a small number of samples only few lymphoid cells were seen. Thus, we agree that both, the presence of lymphoid tissue and the variability in size of lymphatic nodules are normal features.^{13,9} As in guinea pigs, the epithelium, overlying the lymphatic nodules is single- to double-layered and often interspersed with lymphoid cells.⁹ Goblet cells were rarely seen in this area.

The characteristics of the conjunctiva and the distribution of conjunctival goblet cells of five different rodents are summarized in Table 3.

Several solitary goblet cells may occur in the conjunctiva of chinchillas. Their density and distribution varies within the different zones, as in guinea pigs.^{9,14,15-18} *T*-test for independent samples was used to compare the mean goblet cell density of each conjunctival zone with those of the guinea pig (Table 4). In all four palpebral conjunctival zones chinchillas revealed a significantly higher goblet cell density than guinea pigs, whereas the goblet cell density in all four bulbar zones is significantly higher in guinea pigs than in chinchillas. (Table 4) A comparison to other studies in guinea pigs, rats, mice, hamsters and gerbils is difficult since the results of these studies are not quantitative. In fact, the goblet cell density in fornices of guinea pigs was often determined as moderate to high.^{15,14,26} This zone is equivalent to the lymphonodular area in the chinchilla, which did not show higher densities.

Harderian gland

Chinchillas, guinea pigs,^{9,10,27-29} rats,^{10,27,29-31} mice,^{10,29,32-34} hamsters^{10,29,35,36} and gerbils³⁷⁻⁴⁰

possess a well-developed Harderian gland which is covered by a connective tissue capsule and is situated on the posterior part of the globe deep within the orbit.

Our histological findings are similar to those in previous studies on guinea pigs,^{9,10,12,27,28} rats,^{10, 43, 44} mice,^{32-34,45-47} gerbils,³⁷⁻⁴⁰ hamsters^{41,42} and *Octodon degus*.^{48,49}

However, differences of the Harderian gland of six different rodents, e.g. in size and shape, color, number of secretory cell types and presence of a duct system, exist and are illustrated in Table 5.

In H&E stained sections, the cytoplasm of the glandular cells stains pink and contains vesicles of variable size. Different secretory cell types may be encountered in rats,^{27,30,43,50}

mice,^{34,46,47,50,51} some species of gerbils,^{30,39} male hamsters^{35,42,52,53} and *Octodon degus*,⁴⁸

however we did not find this feature in chinchillas under the light microscope. Rather, we assume that the various sizes of the vesicles, resemble different secretory stages of the cells.

We could confirm lipid contents of the intracellular vesicles as described in guinea pigs,⁹ rats,^{32,43} mice,^{34,46} hamsters,^{35,42} gerbils,^{30,37,39,40} and *Octodon degus*.⁴⁸

Nevertheless, frozen sections stained with Sudan-red are necessary to verify the presence of lipids.

Myoepithelial cells, located between epithelial cells and the basement-membrane of the alveoli, were found in the *Octodon degu*⁴⁸ and the species which are listed in Table 5, except in chinchillas.^{51,43,44,47,34,46,41} It is likely that these cells may become visible in chinchillas using electron microscopy as described in gerbils.^{30,37-40,51}

Lacrimal gland

The lacrimal gland in guinea pigs, mice, hamsters and rats is divided in two parts in several studies.^{10,56,57} Depending on the location, these two portions were named glandula infraorbitalis or - intraorbitalis and glandula extraorbitalis, - exorbitalis or - orbitalis externa. Our anatomical and histological findings are consistent of a glandula infraorbitalis. We did not find a glandula extraorbitalis in chinchillas. The tubuloacinar lacrimal gland is located in the temporoventral part of the orbital rim as mentioned in guinea pigs,^{9,26,58,60,10,12} rats,^{10,56,59} mice¹⁰ and hamsters.¹⁰ The histology is similar to findings in previous studies on guinea pigs and rats.^{9,10,12,60,58} Unfortunately, no studies are available on the gerbil or the *Octodon degu*. Differences in size, shape and color of the lacrimal gland in chinchillas, guinea pigs, rats, mice and hamsters are illustrated in Table 6.

Due to the different staining pattern with AB and PAS, we assume that the lacrimal gland in chinchillas consists of different cell types. Three different cell types, distributed in a specific pattern, could be distinguished in guinea pigs.⁹ In contrast to guinea pigs⁹, the differently stained acini were diffusely distributed throughout the gland and did not follow a specific pattern. We assume that the different cell types produce different mucins since some stained positive with AB and others with PAS.

The histological appearance of the ducts is similar in guinea pigs, rats, mice and hamsters.^{9,60,10,12,58,}

Lacrimal puncta

The lacrimal system of the chinchilla is similar to other rodents.⁵

Nicitating membrane

As in the study by Peiffer and Johnston⁴ we found a vestigial nictitating membrane likewise to guinea pigs,^{9,26} rats,^{23,19} and mice.²⁰ The nictitating membrane is lined with a stratified epithelium and goblet cells similar to rats.^{15,25} As in mice²⁰ and gerbils (*Meriones meridianus*)³⁷ a hyaline cartilage, extending from the base to the rim, was found in chinchillas.

CONCLUSION

In summary, the palpebral conjunctiva in chinchillas revealed the highest density of mucin-producing goblet cells. Furthermore the small lacrimal gland seems to play a role in mucin-production since some acini stained positive for PAS and AB. Chinchillas have Meibomian glands, although the openings of the excretory ducts are not discernible with a handheld biomicroscope. The Meibomian glands and the prominent Harderian gland seem to be the main sources for ocular lipid production. We assume that all of the aforementioned structures play an important role in the tear film composition of chinchillas. The low blinking frequency may be the consequence of a very stable tear film, which possibly results from a thick lipid layer of the precorneal tear film. Nevertheless, further investigations on the composition of the precorneal tear film in chinchillas are necessary. This study provides the basis for further qualitative studies of the tear film in chinchillas.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Karin Fragner from the Department of Pathobiology for her technical support and helpful suggestions during the section- and staining-procedure as well as Klaus Bittermann and Manuela Russ for their help with editing of pictures and drawings in the Adobe-Photoshop[®]-Program.

Furthermore we would like to thank James Rushton for his great help in proofreading the manuscript.

1. Grzimek B. Mammals V. In: Hutchins M, Kleimann DG, Geist VG, Mc Dade MC, editors. *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. 2 ed. Farmington Hills, MI: Gale-Group; 2003. p. 121-478.
2. Storch G, Thenius E. Nagetiere (Rodentia). In: Grzimek B, editor. *Grzimek's Enzyklopädie Säugetiere Nagetiere*. München: Kindler Verlag GmbH; 1988. p. 2-23.
3. Detwiler SR. The eye of the chinchilla, *C. lanigera*. *Journal of Morphology*. 1949;84(1):123-44.
4. Peiffer RL, Johnston PT. Clinical ocular findings in a colony of chinchillas (*Chinchilla laniger*). *Laboratory Animals*. 1980;14:331-5.
5. Crossley D, Roxburgh G, editors. Anatomy of the Chinchilla (*Chinchilla lanigera*) Lacrimal Drainage System (abstract). *British Small Animal Veterinary Association Congress* 1999; Birmingham
6. Lima L, Montiani-Ferreira F, Tramontin M, Leigue dos Santos L, Machado M, Ribas Lange R, et al. The chinchilla eye: Morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. *Veterinary Ophthalmology*. 2010;13(SUPPL. 1):14-25.
7. Müller K, Mauler DA, Eule JC. Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests and clinical characteristics of chinchilla eyes (*Chinchilla lanigera*). *Veterinary Ophthalmology*. 2010;13(SUPPL. 1):29-34.
8. Böck P. *Romeis - Mikroskopische Technik*. 17th edn, Urban&Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 1989; 438-449.
9. Gasser K, Fuchs-Baumgartinger A, Tichy A, Nell B. Investigations on the conjunctival goblet cells and on the characteristics of glands associated with the eye in the guinea pig. *Veterinary Ophthalmology*. 2011;14(1):26-40.

10. Kittel R. Vergleichend-anatomische Untersuchungen über die Orbitaldrüsen der Rodentia. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, mathematisch-naturwissenschaftliche Reihe*. 1962;11(4):401-28.
11. Quay WB. *The Meibomian glands of voles and lemmings (Microtinae)*. 1 ed. Museum of Zoology UoM, Miscellaneous publications, No. 82, editor. Ann Arbor: University of Michigan Press; 1954.
12. Walde I, Nell B. Chapter 22: Meerschweinchen. In: Walde I, Nell, B., Schäffer, E.H., Köstlin, R., editor. *Augenheilkunde- Lehrbuch und Atlas Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen*. 3rd ed. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2008. p. 761-4.
13. Dwyer RSC, Darougar S, Monnickendam MA. Unusual features in the conjunctiva and cornea of the normal guinea-pig: Clinical and histological studies. *British Journal of Ophthalmology*. 1983;67(11):737-41.
14. Nichols BA. Conjunctiva. *Microscopy Research and Technique*. 1996;33(4):296-319.
15. Latkovic S. The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. III. The bulbar zone, the zone of the fornix and the supranodular zone. *Acta Ophthalmologica*. 1979a;57(2):305-20.
16. Latkovic S. The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. IV. The palpebral and the perimarginal zones. *Acta Ophthalmologica*. 1979b;57(2):321-35.
17. Latkovic S, Nilsson SEG. The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. I. The basal and intermediate layers of the perilimbal zone. *Acta Ophthalmologica*. 1979a;57(1):106-22.
18. Latkovic S, Nilsson SEG. The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. II. The superficial layer of the perilimbal zone. *Acta Ophthalmologica*. 1979b;57(1):123-35.

19. Huang AJW, Tseng SCG, Kenyon KR. Morphogenesis of rat conjunctival goblet cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1988;29(6):969-75.
20. Smith R, Sundberg J, John S. Regional Anatomy and Development. In: Smith R, John S, Nishina P, Sundberg J, editors. *Systematic evaluation of the mouse eye anatomy, pathology, and biomethods*. Boca Raton: CRC Press LLC; 2002. p. 3-13.
21. Böck P, Hanak H. Some remarks on the morphology of the guinea pig conjunctival epithelium. *Journal of Submicroscopical Cytology*. 1971;3:1-8.
22. Micali A, Puzzolo D, Pisani A, Arco AM, Bruschetta D, Santoro G, et al. Ultrastructural study of the conjunctival epithelium in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Ophthalmic Research*. 1998;30(4):244-54.
23. Setzer PY, Nichols BA, Dawson CR. Unusual structure of rat conjunctival epithelium. Light and electron microscopy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 1987;28(3):531-7.
24. Chodosh J, Nordquist RE, Kennedy RC. Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site. *Developmental and Comparative Immunology*. 1998;22(5-6):621-30.
25. Astley RA, Chodosh J, Caire W, Wilson GM. Conjunctival lymphoid follicles in new world rodents. *Anatomical Record*. 2007;290(9):1190-4.
26. Cooper G, Schiller AL, editors. *Anatomy of the guinea pig*. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press; 1975. p. 370-375
27. Buschke W. Die Hautdrüsenorgane (Haversche Drüsen, Inguinaldrüsen, Präputialdrüsen, Analdrüsen, Kaudaldrüsen, Kieferdrüsen) der Laboratoriumsnagetiere und die Frage ihrer Abhängigkeit von den Geschlechtsdrüsen. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 1933;18(1-2):217-43.

28. Loewenthal N. Drüsenstudien. I. Die Harder'sche Drüse. *Internationale Monatsschrift für Anatomie und Physiologie*. 1896;13:27-65.
29. Sakai T. The mammalian Harderian gland: morphology, biochemistry, function and phylogeny. *Archivum Histologicum Japonicum*. 1981;44(4):299-333.
30. Djeridane Y. Comparative histological and ultrastructural studies of the Harderian gland of rodents. *Microscopy Research and Technique*. 1996;34(1):28-38.
31. Venable JH, Graffin AL. Gross anatomy of the orbital glands in the albino rat. *Journal of Mammalogy*. 1990;21:66-71.
32. Cohn SA. Histochemical observations on the Harderian gland of the albino mouse. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 1955;3:342-53.
33. Loewenthal N. Beitrag zur Kenntnis der Harder'schen Drüse bei den Säugetieren. *Anatomischer Anzeiger*. 1892;7:546-56.
34. Woodhouse MA, Rhodin JAG. The ultrastructure of the Harderian gland of the mouse with particular reference to the formation of its secretory product. *Journal of Ultrastructure Research*. 1963;9(1-2):76-98.
35. Payne AP, McGadey J, Johnston HS. The Structure of the Harderian Gland of the Golden Hamster. In: Webb SM, Hoffman RA, Puig-Domingo ML, Reiter RJ, editors. *Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 1992. p. 53-67.
36. Gesase AP, Satoh Y. Sexual differences and effects of castration on secretory mode and intracellular calcium ion dynamics of golden hamster Harderian gland. *Cell and Tissue Research*. 2001;304(1):81-90.
37. Sakai T, Yohro T. A histological study of the Harderian gland of Mongolian gerbils, *Meriones meridianus*. *Anatomical Record*. 1981;200(3):259-70.

38. Johnston HS, McGadey J, Thompson GG. The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Anatomy*. 1983;137(3):615-30.
39. Djeridane Y. The harderian gland of desert rodents: A histological and ultrastructural study. *Journal of Anatomy*. 1992;180(3):465-80.
40. Sabry I, Al-Azemi M, Al-Ghaith L. The Harderian gland of the Cheesman's gerbil (*Gerbillus cheesmani*) of the Kuwaiti Desert. *European Journal of Morphology*. 2000;38(2):97-108.
41. Bucana CD, Nadakavukaren MJ. Fine structure of the hamster harderian gland. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 1972;129(2):178-87.
42. Buzzell GR. Sexual dimorphism in the Harderian gland of the Syrian hamster is controlled and maintained by hormones, despite seasonal fluctuations in hormone levels: Functional implications. *Microscopy Research and Technique*. 1996;34(2):133-8.
43. Djeridane Y. The harderian gland and its excretory duct in the Wistar rat. A histological and ultrastructural study. *Journal of Anatomy*. 1994;184(3):553-66.
44. Müller HB. Die postnatale Entwicklung der Harderschen Drüse der weißen Ratte - I. Lichtmikroskopische Befunde. *Zeitschrift für Zellforschung*. 1969;100(3):421-38.
45. Miessner H. Die Drüsen des dritten Augenlides einiger Säugethiere. *Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde*. 1900;26:122-54.
46. Strum JM, Shear CR. Harderian glands in mice: Fluorescence, peroxidase activity and fine structure. *Tissue and Cell*. 1982;14(1):135-48.
47. Watanabe M. An autoradiographic, biochemical, and morphological study of the Harderian gland of the mouse. *Journal of Morphology*. 1980;163(3):349-65.

48. Antolin-Gonzalez I, Uria H, Tolivia D, Menendez-Pelaez A. The harderian gland of the rodent *Octodon degus*: A structural and ultrastructural study. *Tissue and Cell*. 1993;25(1):129-39.
49. Tolivia D, Antolin I, Menendez-Pelaez A, Rodriguez-Colunga MJ. Lymphoid cells in the Harderian gland of the rodent *Octodon degus*. *Anatomical Record*. 1992;234(3):438-42.
50. Payne AP. The harderian gland: A tercentennial review. *Journal of Anatomy*. 1994;185(1):1-49.
51. Ortiz GG, Feria-Velasco A, Falcon-Franco MA, Bitzer-Quintero OK, Garcia JJ, Rosales SA, et al. Different patterns in the histology and autofluorescence of the Harderian glands of the Syrian hamster, rat, mouse, Mongolian gerbil and guinea pig. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 2001;30(2):107-15.
52. Bucana CD, Nadakavukaren MJ. Ultrastructural investigation of the postnatal development of the hamster Harderian gland. II. Male and female. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 1973;142(1):1-12.
53. Lopez JM, Carbajo-Perez E, Fernandez-Suarez A, Alvarez-Uria M. Postnatal development of cell types in the hamster Harderian gland. *Microscopy Research and Technique*. 1996;34(1):48-54.
54. Djeridane Y. The Harderian gland in diabetic sand rats (*Psammomys obesus*) a light microscopic study. *Experimental Eye Research*. 2002;75(6):753-9.
55. Kamocki W. Über die sogenannte Harder'sche Drüse der Nager. *Biologisches Zentralblatt*. 1883;2(23):709-17.
56. Loewenthal N. Drüsenstudien. II. Die Glandula infraorbitalis und eine besonders der Parotis anliegende Drüse bei der weißen Ratte. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 1900;56:535-52.

57. Lorber M. Regional differences within the external 'duct' of the rat exorbital lacrimal gland. *Experimental Eye Research*. 1993;56(4):471-80.
58. Loewenthal N. Zur Kenntnis der Glandula infraorbitalis einiger Säugetiere. *Anatomischer Anzeiger*. 1895;10:123-30.
59. Luciano L. Die Feinstruktur der Tränendrüse der Ratte und ihr Geschlechtsdimorphismus. *Zeitschrift für Zellforschung*. 1967;76(1):1-20.
60. Krochmalska L. Histological and Histochemical Picture of the Lacrimal Gland in Guinea Pig. *Acta Theriologica*. 1976;21(3):31-6.



Fig. 1 Meibomian glands: The temporal broadened glandular complexes (*) are macroscopically visible through the conjunctiva.

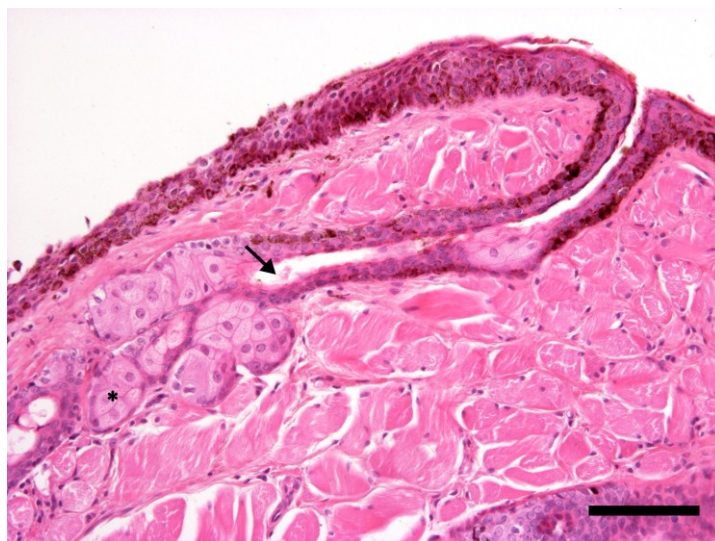


Fig. 2 Meibomian glands: The glandular acini (*) are arranged in a row. The excretory duct (arrow) merges on the conjunctival side of the lid margin. Bar = 100 μ m, H&E

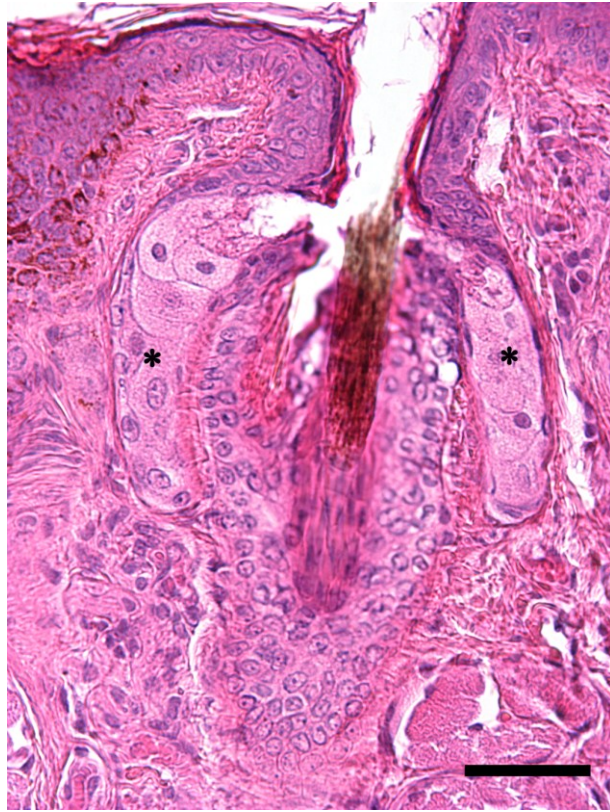


Fig. 3 The glands of Zeis (*): Sebaceous gland, with opening into the hair follicle.
Bar = 50 μ m, H&E

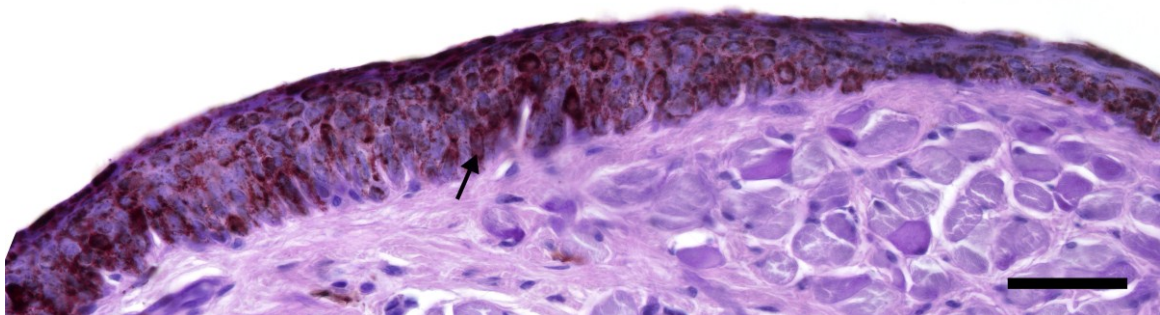


Fig. 4a Marginal zone of the conjunctiva with melanocytes (arrow). Bar = 50 μ m, PAS

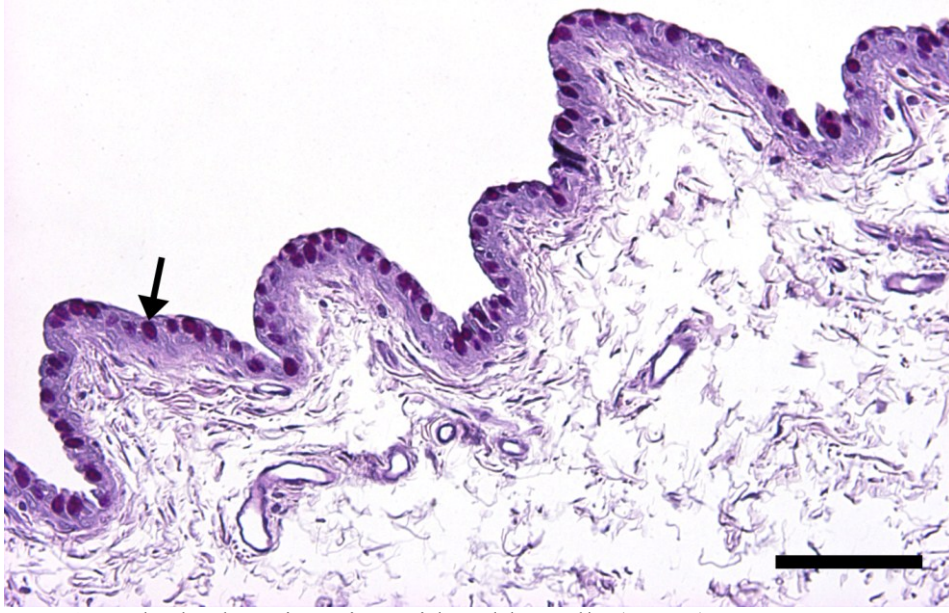


Fig. 4b Palpebral conjunctiva with goblet cells (arrow). Bar = 50 μ m, PAS

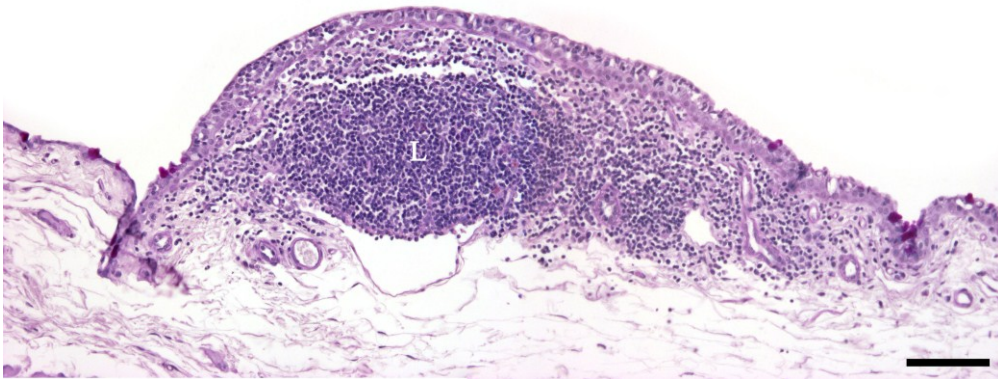


Fig. 4c Lymphonodular zone (L) of the conjunctiva. Bar = 100 μ m, PAS

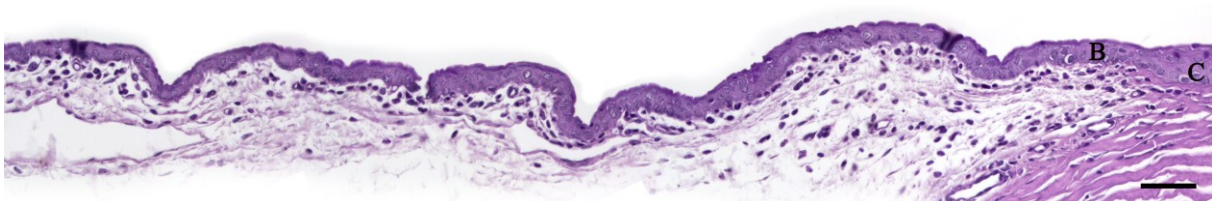


Fig. 4d Bulbar conjunctiva. The conjunctival epithelium (B) turns into the corneal epithelium (C). Bar = 100 μ m, PAS

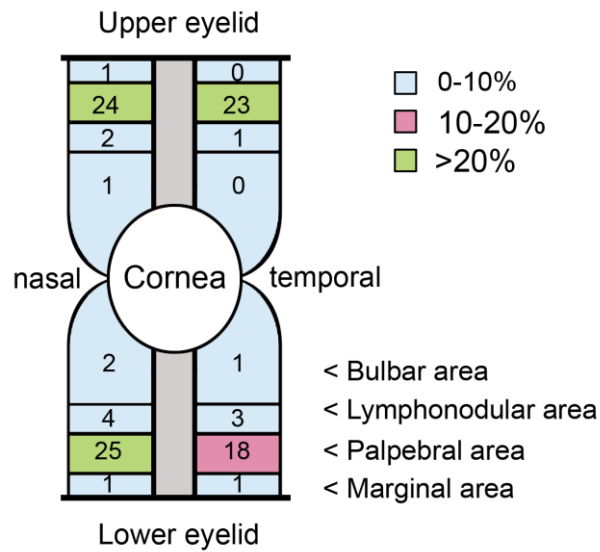


Fig. 5 Mean goblet cell densities: Highest densities were found in the nasal and temporal palpebral conjunctiva of the upper and lower eyelid. Lowest densities were found in the nasal and temporal part of the marginal and bulbar area of both eyelids

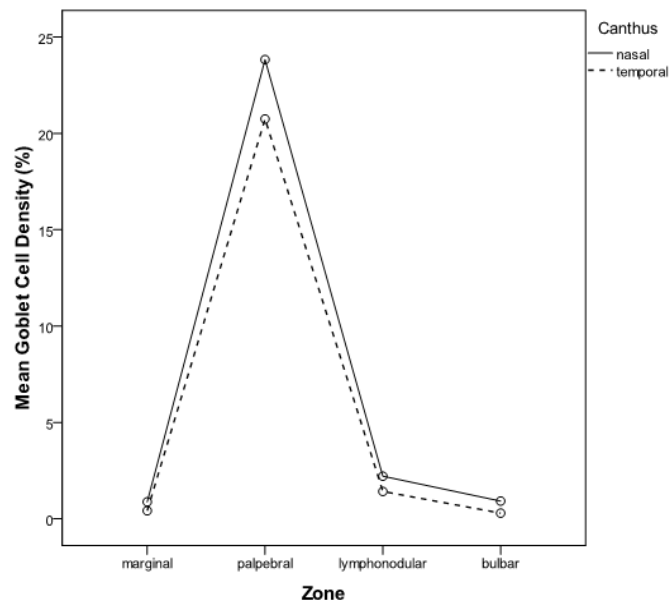


Fig. 6 Mean goblet cell densities for the 4 zones in both eyelids.

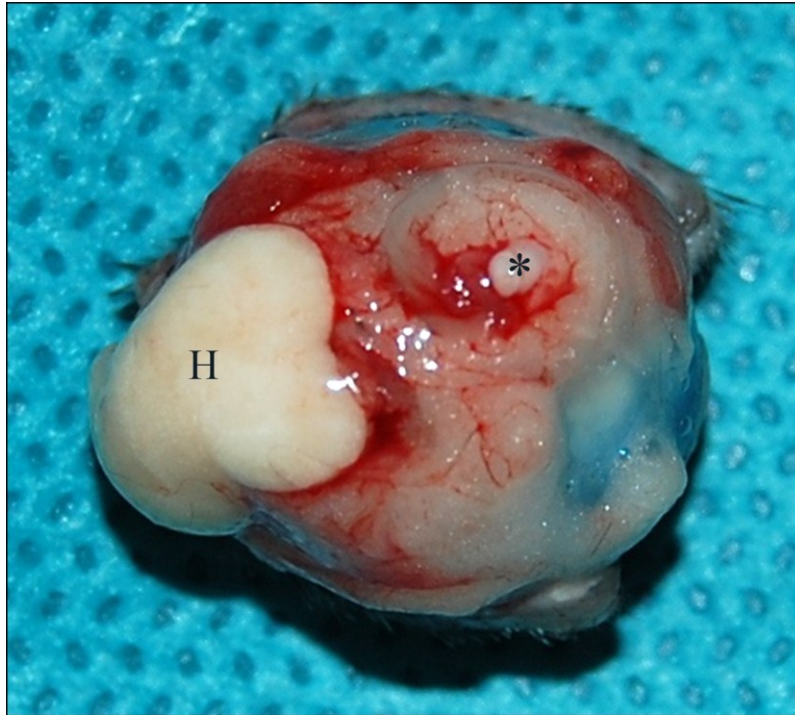


Fig. 7 Harderian gland (H): Caudal aspect of the eye. The whitish gland extends nasally from the optic nerve (*) to the equator and is approximately 0.9 cm in length.

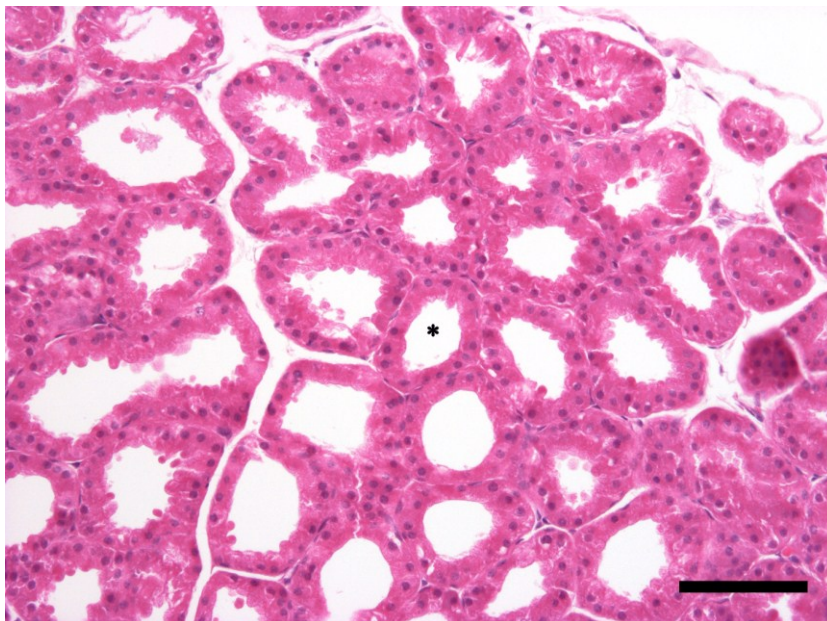


Fig. 8 Harderian gland: The tubuli and alveoli of the Harderian gland show wide lumina (*). Bar = 100 μ m, H&E

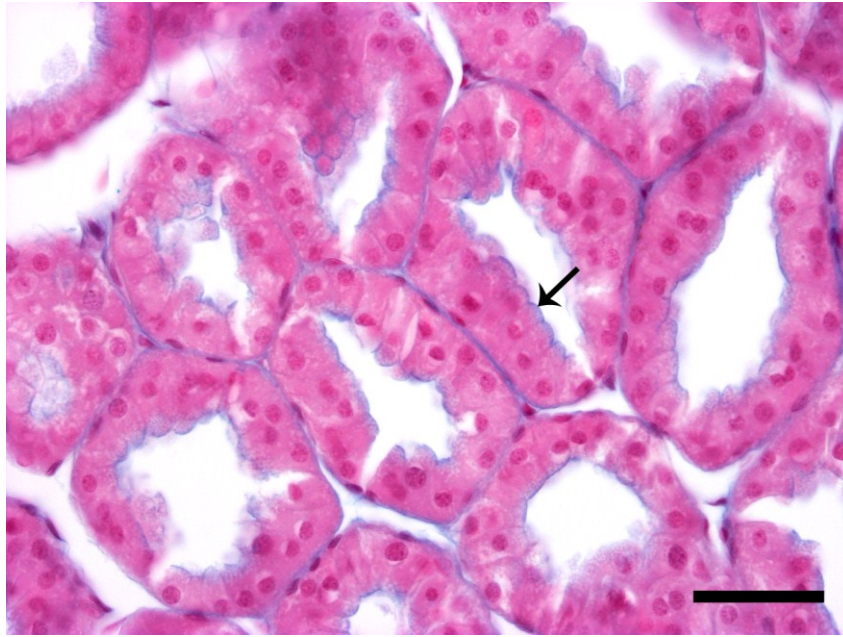


Fig. 9a

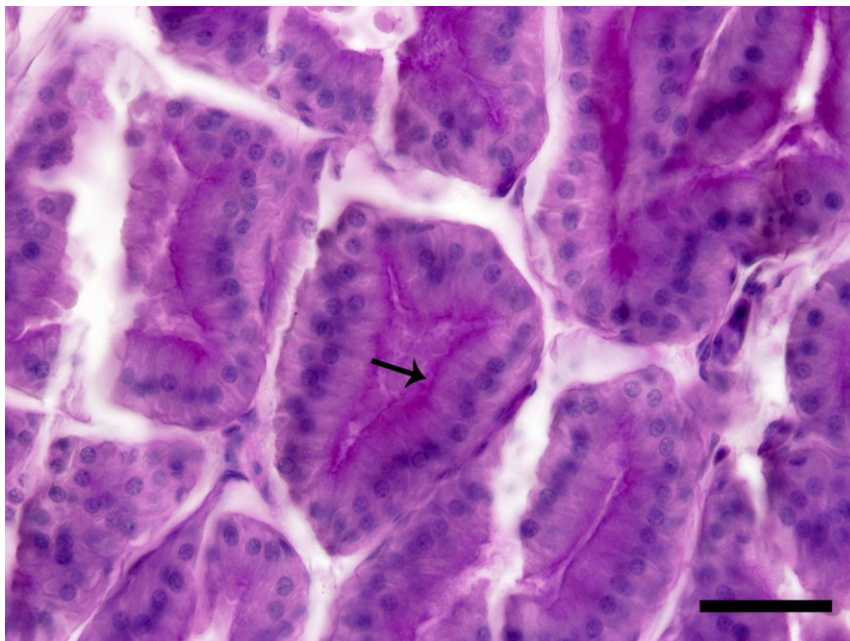


Fig. 9b The glycocalyx (arrow) of the glandular cells of the Harderian gland stains positive with AB (**9a**) and PAS (**9b**); Bar = 50 μ m (a = AB; b= PAS)

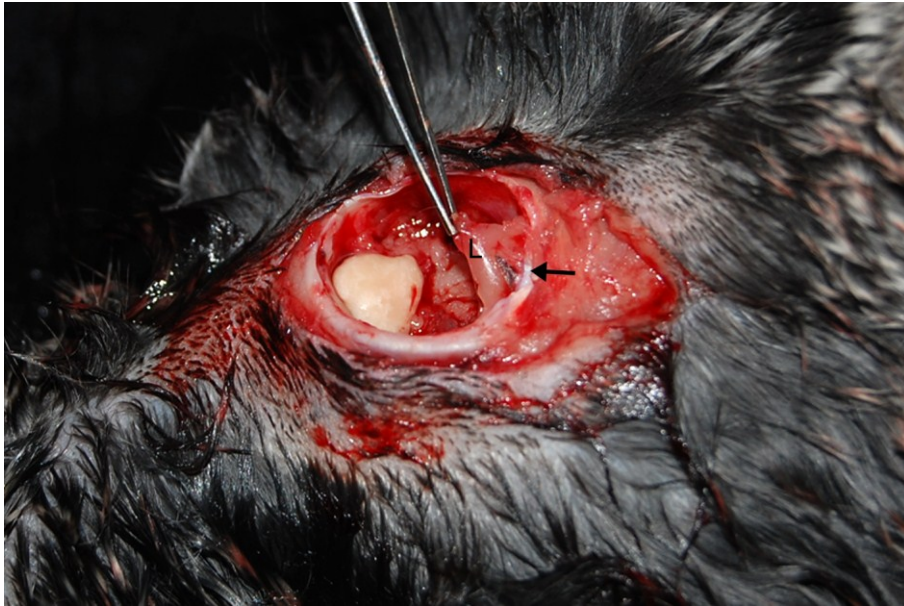


Fig. 10 Lacrimal gland: The crescent shaped lacrimal gland (L) is firmly attached to the temporal margin of the orbital rim (arrow).

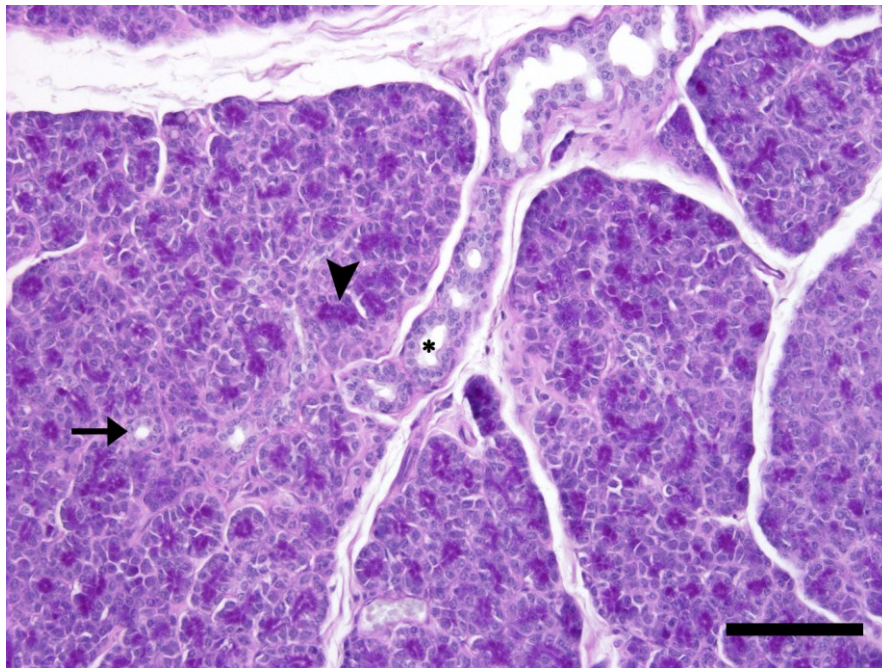


Fig. 11a Lacrimal gland: (a) A tubuloacinar gland with clearly discernable inter- (*) and intralobular ducts (arrow). Some acini stain positive with PAS (arrowhead); Bar = 100 μ m, PAS

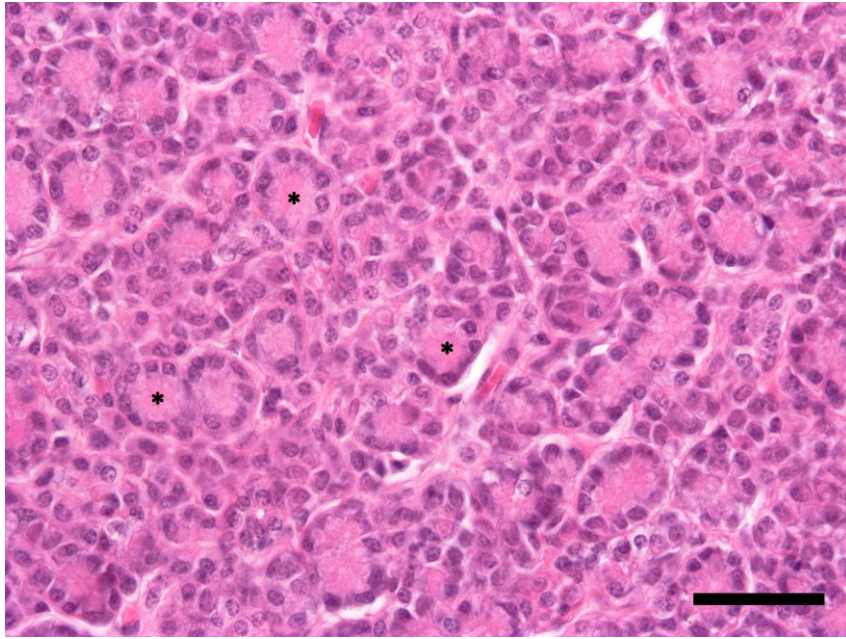


Fig. 11b Lacrimal gland: (b) A lumen of the acini and tubuli (*) is hardly discernable ; Bar = 50 μ m, H&E

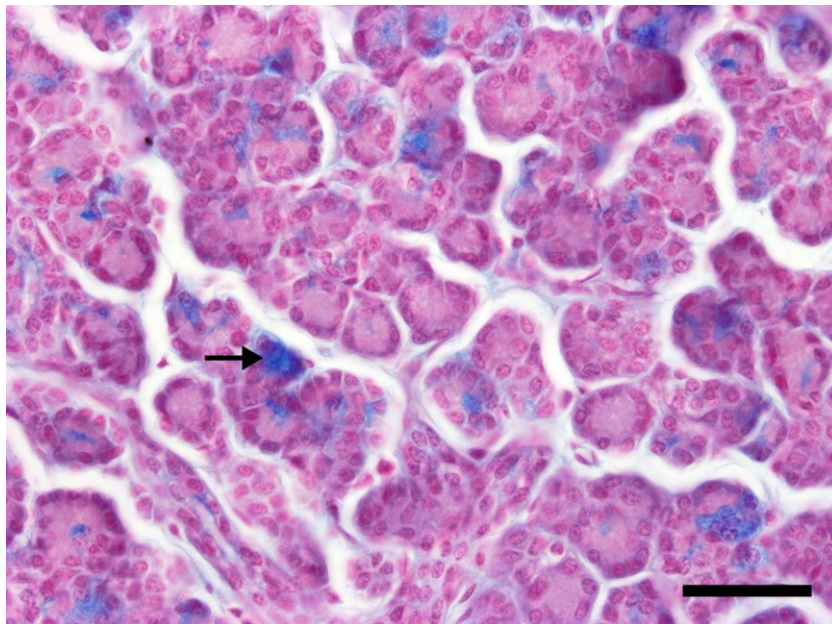


Fig. 11c Lacrimal gland: (c) Single glandular cells of some acini stain positive with AB (arrow); Bar =50 μ m, AB

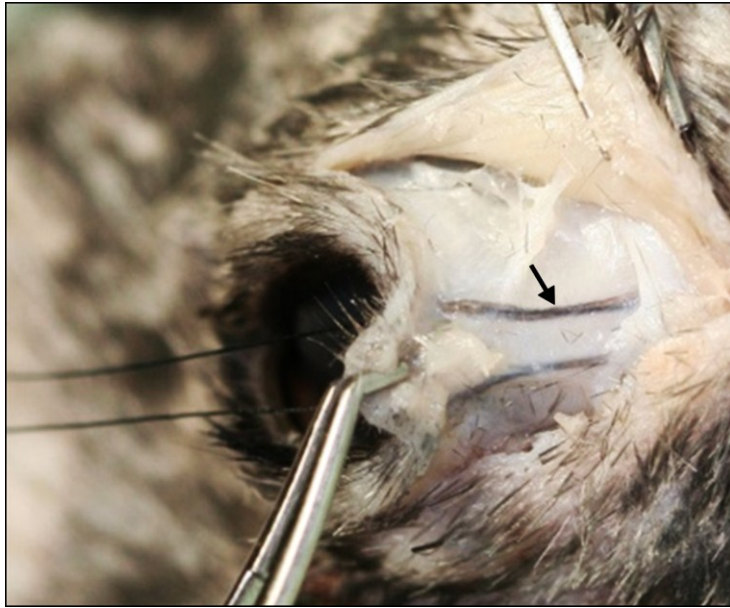


Fig. 12 Two lacrimal canaliculi originate from 2 lacrimal puncta which are situated on the nasal surface of both eyelids. Lacrimal canaliculi (arrow) are visualized with a Monosyn 6/0



Fig. 13 The vestigial nictitating membrane is triangular in shape and pigmented at its free margin (white arrow).

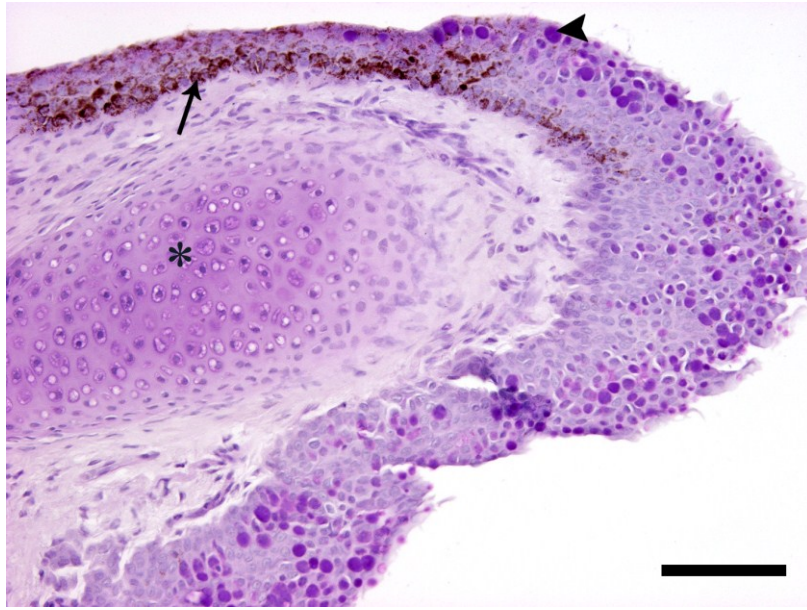


Fig. 14 The nictitating membrane shows a stratified epithelium with goblet cells (arrowhead) and melanocytes (arrow). A hyaline cartilage (*) can be seen. Bar = 100 μ m, PAS

Table 1 Goblet cell indices- Descriptive statistics for each region

Region	Number of samples	Min (%)	Max (%)	Mean (%)	SD (%)
LL N M	18	0.0	2.5	0.6	0.7
LL N P	20	1.5	47.0	25.1	10.8
LL N L	17	0.0	20.0	3.9	5.9
LL N B	20	0.0	20.3	1.5	4.5
LL T M	17	0.0	9.0	0.7	2.2
LL T P	20	1.0	38.5	18.2	11.1
LL T L	19	0.0	14.1	2.6	4.0
LL T B	20	0.0	7.3	0.5	1.6
UL N M	19	0.0	9.5	1.1	2.4
UL N P	19	0.0	49.5	23.9	12.5
UL N L	13	0.0	10.0	1.9	3,2
UL N B	19	0.0	2.8	0.5	0.9
UL T M	18	0.0	2.0	0.2	0.5
UL T P	19	0.0	44.5	23.1	12.2
UL T L	9	0.0	3.5	0.9	1.2
UL T B	19	0.0	0.3	0.0	0.1

LL, Lower lid; UL, Upper lid; N, nasal; T, temporal; M, marginal;
P, palpebral; Ln, lymphonodular; B, bulbar; Min, minimum;
Max, maximum; SD, standard deviation

Table 2 Goblet cell indices- Main effects of repeated measures
ANOVA^a

Source	F	df	dferror	P-value
Upper vs. lower lid	< 1	1	4	0,807
Temporal vs. nasal canthus	8,46	1	4	0,044
Zone vs. zone (M, P, Ln, B)	46,50	3	12	0,000 ^b

ANOVA, analysis of variance; df, degrees of freedom; M, marginal; P, palpebral; Ln, lymphonodular; B, bulbar.

Difference was not significant between upper and lower lid (P= 0.807).

Significant differences were seen between the nasal and temporal canthus and among the 4 zones.

a calculations based on data including means substituted for missing values.

b *Post hoc* procedures (least significant difference-data not shown) showed that the palpebral zone differed significantly from the other 3 zones (P= 0.02; P= 0.001; P= 0.003), whereas there is no significantly difference between marginal, lymphonodular and bulbar zone (P= 0.083; P= 0.843; P= 0.183).

Statistical significance was set at P < 0.05.

Table 3 Characteristics of the conjunctiva in 5 different rodents

Feature		Chinchilla	Guinea pig	Rat	Mouse	Gerbil
Number of zones		4 zones	3 to 6 zones ^{14,13,9,15-18}	5 zones ¹⁹	3 zones ²⁰	Not specified
Morphology of the Epithelium		Non-keratinized	Non-keratinized ^{21,17}	Squamous ²³	Not specified	Ovoidal epithelial cells ²²
		2 to 4 cell layers	3 to 6 cell layers ^{9,21,15-18,14}	5-7 cell layers ²³	2 to 7 cell layers ²⁰	3 to 4 cell layers ²²
Lymphatic nodules	Existence	Normal feature	Normal feature ^{9,13}	Absent in Sprague Dawley rats ²³ and in Wistar rats ²⁴	Absent in wild population of house mouse ²⁵ and non-germ-free adult BALB/C mice ²⁴	Not specified
	Size	Variable	Variable ^{9,13}			
	Localisation	Half distance between cornea and lid margin	Half distance between cornea and lid margin (Fornix) ^{9,13,14}			
	Overlying Epithelium	1 to 2 cell layers	1 to 2 cell layers ^{9,13,14}			
Goblet cells	Occurrence	Solitary	Solitary ^{9,15-18,14}	In clusters ^{23,19}	Not specified	Solitary or in clusters ²²
	Density and Distribution	Highest: palpebral Lowest: bulbar and marginal	Highest: palpebral ^{9,16} Lowest: bulbar and limbal ^{9,14,15,17,18} Moderate to high: fornix ^{15,14,25}	Highest: fornix ¹⁹ Lowest: bulbar and tarsal (palpebral) ¹⁹	Highest: fornix ²⁰ Numerous: tarsal and bulbar	Distributed throughout entire conjunctiva ²²

Table 4 Goblet cell indices (GCI) - Comparison between Chinchillas and Guinea pigs⁹

	Chinchilla			Guinea pig⁹			Significance p
Region	Number of samples	Mean GCI (%)	SD (%)	Number of samples	Mean GCI (%)	SD (%)	
LL N M	18	0.6	0.7	22	4.0	3.5	0.000
LL N P	20	25.1	10.8	22	14.6	4.5	0.000
LL N L	17	3.9	5.9	22	2.0	2.0	0.174
LL N B	20	1.5	4.5	22	16.4	6.8	0.000
LL T M	17	0.7	2.2	23	1.2	1.7	0.456
LL T P	20	18.2	11.1	23	7.9	5.9	0.000
LL T L	19	2.6	4.0	22	3.7	5.4	0.469
LL T B	20	0.5	1.6	22	11.5	6.5	0.000
UL N M	19	1.1	2.4	21	4.9	3.7	0.000
UL N P	19	23.9	12.5	23	16.1	5.4	0.009
UL N L	13	1.9	3.2	22	6.1	8.3	0.089
UL N B	19	0.5	0.9	22	14.8	5.1	0.000
UL T M	18	0.2	0.5	23	3.6	5.6	0.014
UL T P	19	23.1	12.2	23	13.7	7.0	0.003
UL T L	9	0.9	1.2	13	10.6	9.0	0.005
UL T B	19	0.0	0.1	23	11.4	5.8	0.000

Table 5 Differences of the Harderian glands in 6 different rodents

Feature	Chin-chilla	Guinea pig	Rat	Mouse	Gerbil	Hamster
Size/ Shape	0.9 cm in length Oval-shaped Macroscopically non-lobuated	Between half and two-thirds of the volume of the globe ⁹ Macroscopically lobulated gland ⁹	Extends for seven-eighth of the bulbar circumference ³¹ Horseshoe-shaped ¹⁰ 3 lobes are macroscopically detectable ³¹	0.7-0.9 cm in length ^{32,34} Horse-shoe-shaped ^{32,34} 2 lobes are macroscopically detectable ^{32,34}	Crescent-shaped ³⁸ 3 lobes ³⁸	Horseshoe-shaped ³⁵ 2 lobes ³⁶
Color	Whitish	Whitish to slightly pink ⁹	Female: speckled with dark-brown pigment spots ¹⁰	Pink, with dark pigment particles ³² to grayish white ³⁴	Dark-gray ³⁷ to black brown ³⁸ yellowish with brown pigment spots ⁴⁰	Female: speckled with black-brown pigment ^{10,36,41} Male: uniformly light yellow ³⁶
Number of secretory cell types	1 secretory cell type	1 secretory cell type ^{27,51}	2 secretory cell types ^{43,44,51}	2 secretory cell types ^{34,46}	1 to 3 secretory cell types ^{30,39}	Female: 1 secretory cell type ^{42,51,53} Male: 2 secretory cell types ^{42,51-53}
Duct system	Small intra- and intraglandular ducts	Intra- and interlobular ducts ⁹	Intra-and Inter-lobular ducts ¹⁰ No ducts within the gland in Diabetic Sand rats ⁵⁴	Ducts were rarely observed ⁴⁶	No distinct duct system within the gland ³⁹ One straight intra-glandular duct ³⁸	No morphologically distinct duct system ³⁵
Opening of the excretory duct	Not found	Inner or outer surface of the vestigial nictitating membrane ^{10,55,33}	Concave surface of the third eyelid ^{43,10}	Concave surface of the third eyelid ^{32,46}	Nasal surface of the third eyelid ³⁷ or nasally and ventrally of the third eyelid ³⁶	Inner surface of the nictitating membrane ¹⁰

Table 6 Differences in size, shape and color of the lacrimal gland in 5 different rodents

Feature	Chinchilla	Guinea pig	Rat	Mouse	Hamster
Size and shape	Crescent-shaped Length: approx. 0.8-1.0 cm	Triangular ^{9, 10, 12} to crescentic ²⁶ Length: as long as one eyelid ⁹	Triangular ¹⁰ Relatively large ¹⁰	Discoid ¹⁰ Diameter: 0.5 cm ¹⁰	Triangular ¹⁰ Length: 0.9 cm ¹⁰
Color	Reddish	Light pink to light brown ⁹ or gray ²⁶	Yellow- brownish ⁶¹	Not described	Not described

Voigt Susanne

Von: onbehalfof+wilkie.1@osu.edu@manuscriptcentral.com im Auftrag von wilkie.1@osu.edu
Gesendet: Samstag, 3. Dezember 2011 20:50
An: Susanne.Voigt@vetmeduni.ac.at
Betreff: Veterinary Ophthalmology Decision on Manuscript ID VOP-11-C9-0696.R3

03-Dec-2011

Dear Mrs. Voigt:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Investigations on the conjunctival goblet cells and the characteristics of the glands associated with the eye in chinchillas (Chinchilla laniger)" in its current form for publication in the Veterinary Ophthalmology. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

You will be receiving an additional email with a Copyright Permission Form that must be completed prior to publication.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Veterinary Ophthalmology, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
 Dr. David Wilkie
 Handling Editor, Veterinary Ophthalmology
wilkie.1@osu.edu

Editorial Board Member Comments to Author:

Reviewer(s) Comments to Author:

3. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Bestimmung der Dichte und Verteilung der konjunktivalen Becherzellen und die Beschreibung der Anatomie und Histologie der Drüsen am Auge des Chinchillas.

Zwölf Chinchillas der Familie Chinchilla Laniger (Langschwanzchinchilla) wurden in diese Studie inkludiert.

Die Lidränder, Konjunktivae und die orbitalen Drüsen wurden in 10% Formalin fixiert, in Paraffin eingebettet und 2 µm Schnitte angefertigt.

Die histologischen Schnitte wurden mittels Hämatoxylin und Eosin (H&E) sowie Perjodsäure und Schiff'schem Reagenz (PAS) gefärbt. Zusätzlich zu den oben genannten Färbemethoden wurden die Drüsen mit Alcian Blau (AB) gefärbt.

Die größte Becherzelldichte (25.16-18.13%) tritt in der nasalen und temporalen palpebralen Bindehaut auf, während die geringste Becherzelldichte (1.48-0.03%) im nasalen und temporalen Anteil der bulbären und marginalen Konjunktiva beider Augenlider gefunden wurde.

Die im nasalen Augenwinkel befindliche rudimentäre Nickhaut besitzt einen hyalinen Knorpel, der sich von der Basis bis zur Spitze des dritten Augenlides erstreckt.

Meibomsche Drüsen erstrecken sich entlang der gesamten Länge des Ober- und Unterlides und erweitern sich ampullenartig im Bereich des temporalen Kanthus. Diese temporale Erweiterung kann makroskopisch durch die Bindehaut gesehen werden. Die Öffnungen der Meibomschen Drüsen sind weder makroskopisch noch mit Hilfe des Spaltlampen-biomikroskops sichtbar, weshalb eine Quantifizierung dieser Öffnungen nicht möglich war.

Die ovale weissliche Hardersche Drüse ist die prominenteste Drüse in der Orbita des Chinchillas. Sie erstreckt sich mit einer Länge von 0,9 cm vom kaudalen Pol des Augapfels nasalwärts. Aufgrund ihres histologischen Färbeverhaltens wird eine Lipidproduktion vermutet. Diese Vermutung könnte z.B. durch Sudanrot gefärbte Gefrierschnitte bestätigt werden.

Die schmale halbmondförmige Tränendrüse befindet sich am temporalen Rand der Orbita. Aufgrund der zum Teil positiven Anfärbbarkeit der Drüsenzini mit Alcian Blau (AB) und Perjodsäure und Schiff'schem Reagenz (PAS) wird eine Muzinproduktion vermutet. Dies würde bedeuten, dass die Tränendrüse an der Produktion der Muzinschicht des präokulären Tränenfilms beteiligt ist.

Schlüsselwörter: Chinchilla Laniger, Becherzellen, Tränendrüse, Hardersche Drüse, Meibomsche Drüse

4. Summary

The purpose of the study was to evaluate the density and distribution of conjunctival goblet cells and to characterise the glands associated with the eye in chinchillas. Twelve Chinchillas were included in the study. The conjunctiva, eyelids and ocular glands were embedded in paraffin wax. Two micrometer sections were stained with Hematoxylin and Eosin (H & E) and Periodic Acid Schiff's reaction. Additionally the glands were stained with Alcian Blue (AB). All samples were examined by one person using a standard light microscope.

Highest goblet cell densities were found in the nasal and temporal palpebral conjunctiva of both eyelids (25.16- 18.13%). Lowest densities were found in the nasal and temporal part of the bulbar and marginal conjunctiva in both lids (1.48- 0.03%).

The vestigial nictitating membrane is supported by a hyaline cartilage and is pigmented at its free margin.

Meibomian glands were seen along the entire length of both eyelids. The whole glandular complex broadens towards the temporal canthus which is macroscopically visible through the conjunctiva. The openings of the excretory ducts are not discernible along the lid margin at 16x magnification using a handheld biomicroscope.

The whitish, oval and 0.9 cm long Harderian gland is the most prominent gland in the chinchilla orbit. It is firmly attached to the posterior part of the globe and extends nasally from the optic nerve to the equator. The staining pattern of the Harderian gland indicates lipid production. Frozen sections stained with Sudan-red are necessary to verify this hypothesis.

The pink and crescent-shaped lacrimal gland is small compared to guinea pigs. It lies next to the temporal broadened glandular complexes of the Meibomian glands in the temporal canthus and is firmly attached to the temporal margin of the orbital rim. Based on the staining pattern with Periodic Acid Schiff's reaction (PAS) and Alcian Blue (AB), it is assumed that this gland produces mucins and contributes to the mucin layer of the preocular tear film.

Further investigations are necessary to verify this assumption.

Key words: Chinchilla Laniger, goblet cells, Harderian gland, lacrimal gland, Meibomian gland

5. Literaturverzeichnis

- ANTOLIN-GONZALEZ, I., URIA, H., TOLIVIA, D. und MENENDEZ-PELAEZ, A. (1993): The harderian gland of the rodent *Octodon degus*: A structural and ultrastructural study. *Tissue and Cell*. **25(1)**, 129-39.
- ASTLEY, R. A., CHODOSH, J., CAIRE, W. und WILSON, G. M. (2007): Conjunctival lymphoid follicles in new world rodents. *Anatomical Record*. **290(9)**, 1190-1194
- BÖCK, P. (Ed.) (1989): *Romeis - Mikroskopische Technik*. Urban&Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, p. 438-449.
- BÖCK, P. und HANAK, H. (1971): Some remarks on the morphology of the guinea pig conjunctival epithelium. *Journal of Submicroscopical Cytology* **3**, 1-8.
- BUCANA, C.D. und NADAKAVUKAREN, M. J. (1972): Fine structure of the hamster Harderian Gland. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. **129(2)**, 178-187.
- BUCANA, C. D. und NADAKAVUKAREN, M. J. (1973): Ultrastructural investigation of the postnatal development of the hamster Harderian gland. II. Male and female. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. **142(1)**, 1-12.
- BUSCHKE, W. (1933): Die Hautdrüsenorgane (Hardersche Drüsen, Inguinaldrüsen, Präputialdrüsen, Analdrüsen, Kaudaldrüsen, Kieferdrüsen) der Laboratoriumsnagetiere und die Frage ihrer Abhängigkeit von den Geschlechtsdrüsen. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. **18(1-2)**, 217-243.
- BUZZELL, G. R. (1996): Sexual dimorphism in the Harderian gland of the Syrian hamster is controlled and maintained by hormones, despite seasonal fluctuations in hormone levels: Functional implications. *Microscopy Research and Technique*. **34(2)**, 133-138.
- CHODOSH, J., NORDQUIST, R. E. und KENNEDY, R. C. (1998): Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site. *Developmental and Comparative Immunology*. **22(5-6)**, 621-630.
- COHN, S. A. (1955): Histochemical observations on the Harderian gland of the albino mouse. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **3**, 342-353.
- COOPER, G. und SCHILLER, A. L. (Eds.) (1975): *Anatomy of the guinea pig*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, p. 370-375
- CROSSLEY, D. und ROXBURGH, G. (Eds.) (1999): *Anatomy of the Chinchilla (Chinchilla lanigera) Lacrimal Drainage System*. Clinical research abstract, Proceedings. British Small Animal Veterinary Association Congress, Birmingham
- DETWILER, S. R. (1949): The eye of the chinchilla, *C. lanigera*. *Journal of Morphology*. **84(1)**, 123-144.
- DJERIDANE, Y. (1992): The harderian gland of desert rodents: A histological and ultrastructural study. *Journal of Anatomy*. **180(3)**, 465-480.
- DJERIDANE, Y. (1994): The harderian gland and its excretory duct in the Wistar rat. A histological and ultrastructural study. *Journal of Anatomy*. **184(3)**, 553-566.
- DJERIDANE Y. (1996): Comparative histological and ultrastructural studies of the Harderian gland of rodents. *Microscopy Research and Technique*. **34(1)**, 28-38.
- DJERIDANE, Y. (2002): The Harderian gland in diabetic sand rats (*Psammomys obesus*) a light microscopic study. *Experimental Eye Research*. **75(6)**, 753-759.
- DWYER, R. S. C., DAROUGAR, S. und MONNICKENDAM, M. A. (1983): Unusual features in the conjunctiva and cornea of the normal guinea-pig: Clinical and histological studies. *British Journal of Ophthalmology*. **67(11)**, 737-741.

- GASSER, K., FUCHS-BAUMGARTINGER, A., TICHY, A. und NELL, B. (2011): Investigations on the conjunctival goblet cells and on the characteristics of glands associated with the eye in the guinea pig. *Veterinary Ophthalmology*. **14(1)**, 26-40.
- GESASE, A. P. und SATOH, Y. (2001): Sexual differences and effects of castration on secretory mode and intracellular calcium ion dynamics of golden hamster Harderian gland. *Cell and Tissue Research*. **304(1)**, 81-90.
- GRZIMEK, B. (2003): Mammals V. In: HUTCHINS, M., KLEIMANN, D. G., GEIST, V. G. und MC DADE, M. C. (Eds.): *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. 2 ed. Farmington Hills, MI: Gale-Group, p. 121-478.
- HUANG, A. J. W., TSENG, S. C. G. und KENYON, K. R. (1988): Morphogenesis of rat conjunctival goblet cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. **29(6)**, 969-975.
- JOHNSTON, H.S., MCGADEY, J. und THOMPSON, G. G. (1983): The Harderian gland, its secretory duct and porphyrin content in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Journal of Anatomy*. **137(3)**, 615-630.
- KAMOCKI, W. (1883): Über die sogenannte Harder'sche Drüse der Nager. *Biologisches Zentralblatt*. **2(23)**, 709-717.
- KITTEL, R. (1962): Vergleichend-anatomische Untersuchungen über die Orbitaldrüsen der Rodentia. *Wissenschaftliche Zeitschrift der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, mathematisch-naturwissenschaftliche Reihe*. **11(4)**, 401-428.
- KROCHMALSKA, L. (1976): Histological and Histochemical Picture of the Lacrimal Gland in Guinea Pig. *Acta Theriologica*. **21(3)**, 31-36.
- LATKOVIC, S. (1979 a): The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. III. The bulbar zone, the zone of the fornix and the supranodular zone. *Acta Ophthalmologica*. **57(2)**, 305-320.
- LATKOVIC, S. (1979 b): The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. IV. The palpebral and the perimarginal zones. *Acta Ophthalmologica*. **57(2)**, 321-335.
- LATKOVIC, S. und NILSSON, S. E. G. (1979 a): The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. I. The basal and intermediate layers of the perilimbal zone. *Acta Ophthalmologica*. **57(1)**, 106-122.
- LATKOVIC, S. und NILSSON, S. E. G. (1979 b): The ultrastructure of the normal conjunctival epithelium of the guinea pig. II. The superficial layer of the perilimbal zone. *Acta Ophthalmologica*. **57(1)**, 123-135.
- LIMA, L., MONTIANI-FERREIRA, F., TRAMONTIN, M., LEIGUE DOS SANTOS, L., MACHADO, M., RIBAS LANGE, R. und RUSS, H. H. A. (2010): The chinchilla eye: Morphologic observations, echobiometric findings and reference values for selected ophthalmic diagnostic tests. *Veterinary Ophthalmology*. **13(SUPPL. 1)**, 14- 25.
- LOEWENTHAL, N. (1892): Beitrag zur Kenntnis der Harder'schen Drüse bei den Säugetieren. *Anatomischer Anzeiger*. **7**, 546-556.
- LOEWENTHAL, N. (1895): Zur Kenntnis der Glandula infraorbitalis einiger Säugetiere. *Anatomischer Anzeiger*. **10**, 123-130.
- LOEWENTHAL, N. (1896): Drüsenstudien. I. Die Harder'sche Drüse. *Internationale Monatsschrift für Anatomie und Physiologie*. **13**, 27-65.
- LOEWENTHAL, N. (1900): Drüsenstudien. II. Die Glandula infraorbitalis und eine besonders der Parotis anliegende Drüse bei der weißen Ratte. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. **56**, 535-552.

- LOPEZ, J. M., CARBAJO-PEREZ, E., FERNANDEZ-SUAREZ, A. und ALVAREZ-URIA, M. (1996): Postnatal development of cell types in the hamster Harderian gland. *Microscopy Research and Technique*. **34(1)**, 48-54.
- LORBER, M. (1993): Regional differences within the external 'duct' of the rat exorbital lacrimal gland. *Experimental Eye Research*. **56(4)**, 471-480.
- LUCIANO, L. (1967): Die Feinstruktur der Tränendrüse der Ratte und ihr Geschlechtsdimorphismus. *Zeitschrift für Zellforschung*. **76(1)**, 1-20.
- MICALI, A., PUZZOLO, D., PISANI, A., ARCO, A. M., BRUSCHETTA, D., SANTORO, G. und ARAGONA, P. (1998): Ultrastructural study of the conjunctival epithelium in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Ophthalmic Research*. **30(4)**, 244-254.
- MÜLLER, H. B. (1969): Die postnatale Entwicklung der Harderschen Drüse der weißen Ratte - I. Lichtmikroskopische Befunde. *Zeitschrift für Zellforschung*. **100(3)**, 421-438.
- MÜLLER, K., MAULER, D. A. und EULE, J. C. (2010): Reference values for selected ophthalmic diagnostic tests and clinical characteristics of chinchilla eyes (*Chinchilla lanigera*). *Veterinary Ophthalmology*. **13(SUPPL. 1)**, 29-34.
- NICHOLS, B. A. (1996): Conjunctiva. *Microscopy Research and Technique*. **33(4)**, 296-319.
- ORTIZ, G. G., FERIA-VELASCO, A., FALCON-FRANCO, M. A., BITZER-QUINTERO, O. K., GARCIA, J. J., ROSALES, S. A., RUIZ-RIZO, L. und REITER, R. J. (2001): Different patterns in the histology and autofluorescence of the Harderian glands of the Syrian hamster, rat, mouse, Mongolian gerbil and guinea pig. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. **30(2)**, 107-115.
- PAYNE, A. P., MCGADEY, J. und JOHNSTON, H. S. (1992): The Structure of the Harderian Gland of the Golden Hamster. In: WEBB, S. M., HOFFMAN, R. A., PUIG- DOMINGO, M. L. und REITER, R. J. (Eds.): *Harderian Glands: Porphyrin Metabolism, Behavioral and Endocrine Effects*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg p. 53-67.
- PEIFFER, R. L. und JOHNSTON, P. T. (1980): Clinical ocular findings in a colony of chinchillas (*Chinchilla laniger*). *Laboratory Animals*. **14**, 331-335.
- QUAY, W. B. (1954): The Meibomian glands of voles and lemmings (*Microtinae*). *Ann Arbor , Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan*, p.1-29
- SABRY, I., AL-AZEMI, M. und AL-GHAITH, L. (2000): The Harderian gland of the Cheesman's gerbil (*Gerbillus cheesmani*) of the Kuwaiti Desert. *European Journal of Morphology*. **38(2)**, 97-108.
- SAKAI, T. (1981): The mammalian Harderian gland: morphology, biochemistry, function and phylogeny. *Archivum Histologicum Japonicum*. **44(4)**, 299-333.
- SAKAI, T. und YOHRO, T. (1981): A histological study of the Harderian gland of Mongolian gerbils, *Meriones meridianus*. *Anatomical Record*. **200(3)**, 259-70.
- SETZER, P. Y., NICHOLS, B. A. und DAWSON, C. R. (1987): Unusual structure of rat conjunctival epithelium. Light and electron microscopy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. **28(3)**, 531-537.
- SMITH, R., SUNDBERG, J. und JOHN, S. (2002): Regional Anatomy and Development. In: SMITH, R., JOHN, S., NISHINA, P. und SUNDBERG, J. (Eds.): *Systematic evaluation of the mouse eye anatomy, pathology, and biomethods*. CRC Press LLC, Boca Raton, p. 3-13.

- STORCH, G. und THENIUS, E. (1988): Nagetiere (Rodentia). In: GRZIMEK, B. (Eds.): Grzimek's Enzyklopädie Säugetiere Nagetiere. Kindler Verlag GmbH, München, p. 2-23.
- STRUM, J. M. und SHEAR, C. R. (1982): Harderian glands in mice: Fluorescence, peroxidase activity and fine structure. *Tissue and Cell*. **14(1)**, 135-148.
- VENABLE, J. H. und GRAFFIN, A. L. (1990): Gross anatomy of the orbital glands in the albino rat. *Journal of Mammalogy*. **21**, 66-71.
- WALDE, I. und NELL, B. (2008) Chapter 22: Meerschweinchen. In: WALDE, I., NELL, B., SCHÄFFER, E. H., KÖSTLIN, R. (Eds.): Augenheilkunde- Lehrbuch und Atlas Hund, Katze, Kaninchen und Meerschweinchen. 3rd ed., Schattauer GmbH, Stuttgart, p. 761-764.
- WATANABE, M. (1980): An autoradiographic, biochemical, and morphological study of the Harderian gland of the mouse. *Journal of Morphology*. **163(3)**, 349-365.
- WOODHOUSE, M. A. und RHODIN, J. A. G. (1963): The ultrastructure of the Harderian gland of the mouse with particular reference to the formation of its secretory product. *Journal of Ultrastructure*. **9 (1-2)**, 76-98.

ABBREVIATIONS

AB	Alcian blue
B	bulbar area
GC	goblet cell
GCI	goblet cell index
H&E	Hematoxylin and Eosin
LL	lower eyelid
Ln	lymphonodular area
M	marginal area
N	nasal canthus
P	palpebral area
PAS	Periodic Acid Schiff's reaction
T	temporal canthus
UL	upper eyelid