



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Natalia Angelika Kozłowska

# **Rozwój oceny klinicznej chorób układu oddechowego koni: implementacja koncepcji "jedne drogi oddechowe – jedna choroba"**

Advances in clinical evaluation of equine airway diseases:  
implementation of the “one airway – one disease” concept

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem

Dr hab. Małgorzata Domino, prof. SGGW

Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika

Promotor pomocniczy:

Dr Małgorzata Wierzbicka

Katedra Chorób Dużych Zwierząt i Klinika

Warszawa 2025



### Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 03.10.2025.....

Czytelny podpis promotora .....



### Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 03/10/2025.....

Czytelny podpis autora rozprawy .....





## Spis treści

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| Streszczenie .....                                                              | 7  |
| Wykaz skrótów .....                                                             | 11 |
| Opis pracy .....                                                                | 13 |
| 1. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej .....              | 13 |
| 2. Uzasadnienie podjęcia tematu pracy .....                                     | 15 |
| 2.1. Koncepcja „jedne drogi oddechowe – jedna choroba” .....                    | 15 |
| 2.2. Charakterystyka wybranych chorób układu oddechowego koni .....             | 16 |
| 2.2.1. Astma koni .....                                                         | 18 |
| 2.2.2. Choroby podniebienia miękkiego .....                                     | 22 |
| 2.2.3. Grudkowe zapalenie gardła .....                                          | 23 |
| 2.3. Charakterystyka metod diagnostycznych chorób układu oddechowego koni ..... | 25 |
| 2.3.1. Wywiad i badanie kliniczne .....                                         | 26 |
| 2.3.2. Badanie endoskopowe .....                                                | 28 |
| 2.3.3. Badanie ultrasonograficzne .....                                         | 29 |
| 2.3.4. Badanie rentgenowskie .....                                              | 30 |
| 2.3.5. Tomografia komputerowa .....                                             | 30 |
| 2.3.6. Rezonans magnetyczny .....                                               | 32 |
| 2.3.7. Badania czynnościowe płuc .....                                          | 33 |
| 2.3.7.1. Spirometria .....                                                      | 34 |
| 2.3.7.2. Elektryczna tomografia impedancyjna .....                              | 35 |
| 2.3.7.3. Oscylometria impulsowa .....                                           | 37 |
| 2.4. Rozwój metod diagnostycznych chorób układu oddechowego koni .....          | 37 |
| 3. Cel pracy i hipotezy badawcze .....                                          | 39 |
| 4. Zakres pracy .....                                                           | 41 |
| 4.1. Materiały .....                                                            | 41 |
| 4.1.1. Projekt badań omówionych w publikacji [P.2] .....                        | 41 |
| 4.1.2. Projekt badań omówionych w publikacji [P.3] .....                        | 41 |
| 4.1.3. Projekt badań omówionych w publikacji [P.4] .....                        | 42 |
| 4.2. Metody .....                                                               | 42 |
| 4.2.1. Wywiad .....                                                             | 43 |
| 4.2.2. Badania kliniczne układu oddechowego .....                               | 44 |

|                                                                                            |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.3. Dynamiczne badanie endoskopowe układu oddechowego .....                             | 44 |
| 4.2.4. Spoczynkowe badanie endoskopowe układu oddechowego .....                            | 44 |
| 4.2.5. Analiza popłuczyn z tchawicy i drzewa oskrzelowego.....                             | 45 |
| 4.2.6. Analiza obrazów endoskopowych.....                                                  | 46 |
| 4.2.7. Analiza statystyczna .....                                                          | 48 |
| 4.2.8. Leczenie .....                                                                      | 49 |
| 5. Wyniki i dyskusja.....                                                                  | 50 |
| 5.1. Wyniki badań nad zależnością między chorobami podniebienia i astmą koni ....          | 50 |
| 5.2. Wyniki badań nad zależnością między grudkowym zapaleniem gardła i astmą koni.....     | 53 |
| 5.3. Wyniki badań nad wspomaganą komputerowo diagnostyką grudkowego zapalenia gardła ..... | 56 |
| 5.4. Współwystępowanie chorób podniebienia miękkiego i astmy koni .....                    | 62 |
| 5.5. Współwystępowanie grudkowego zapalenia gardła i astmy koni.....                       | 64 |
| 5.6. Wspomagana komputerowo diagnostyka grudkowego zapalenia gardła .....                  | 68 |
| 6. Weryfikacja hipotez badawczych.....                                                     | 72 |
| 7. Wnioski .....                                                                           | 73 |
| 8. Literatura .....                                                                        | 74 |
| Kopie publikacji i oświadczenia współautorów publikacji.....                               | 91 |
| Oświadczenia współautorów publikacji [P.1] .....                                           | 93 |
| Oświadczenia współautorów publikacji [P.2] .....                                           | 95 |
| Oświadczenia współautorów publikacji [P.3] .....                                           | 97 |
| Oświadczenia współautorów publikacji [P.4] .....                                           | 99 |

## **Streszczenie**

This doctoral dissertation focuses on the application of the “one airway – one disease” concept in equine medicine. Widely recognized in human medicine, this concept is grounded in the anatomical, histological, and functional continuity of the respiratory tract, underscoring the close interrelationship between diseases of the upper and lower airways. Equine asthma (EA) is one of the most frequently diagnosed chronic respiratory diseases in horses. It is considered a civilization-related disease, with its prevalence increasing alongside the intensification of stabling and exposure to organic dust. EA is characterized by chronic inflammation of the lower airways, leading to bronchoconstriction, mucus accumulation, and airway remodeling. As a result, airflow becomes restricted and exercise capacity declines, which significantly affects both animal welfare and performance. A major diagnostic and clinical challenge is posed by mild-to-moderate equine asthma (MEA). MEA often presents subclinically. Its only indicators may be decreased athletic performance or cough of at least 3 weeks of duration. Unlike severe equine asthma (SEA), which manifests obvious symptoms such as dyspnea, cough, and reduced exercise tolerance. Consequently, MEA is frequently underdiagnosed, promoting the progression of inflammatory and structural changes within the airways, worsening prognosis, and preventing early therapeutic intervention. In horses, upper airway diseases are relatively common and include recurrent laryngeal neuropathy (RLN), dorsal displacement of the soft palate (DDSP), palatal instability (PI), nasopharyngeal collapse, and pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH). These conditions significantly compromise upper airway function, leading to impaired airflow and increased respiratory resistance. As a consequence, they may cause a reduction in exercise capacity and performance in affected horses. An increasing number of evidence indicates the coexistence of EA and upper airway diseases. Chronic inflammation in the lower airways may predispose to dysfunction of the pharyngeal muscles and structures, while upper airway diseases can secondarily increase negative pressure, thereby exacerbating the course of asthma. Despite the frequent co-occurrence of these conditions, the underlying mechanisms linking the two disease groups remain insufficiently understood, highlighting the need for further investigation. The inspiration for this dissertation came from both the well-recognized parallels between human and equine asthma and the author’s own clinical observations. In numerous cases, horses diagnosed with asthma also presented concurrent upper airway diseases. This

phenomenon provided the basis for exploring the applicability of the “one airway – one disease” concept in equine medicine, with an extended focus on modern diagnostic technologies and the potential of digital endoscopic image analysis.

The objectives of this dissertation were: (1) to present a basic and advanced imaging and functional respiratory testing methods, as well as a summary of their advantages, limitations, and applications in the diagnosis of selected equine respiratory diseases; (2) to assess the relationship between the occurrence of selected palate diseases (PDs) and SEA, to assess the relationship between the occurrence of PDs and the severity of clinical signs of EA, and to assess the impact of pharmacological treatment of EA on the occurrence of PDs; (3) to assess the relationship between the occurrence of PLH and EA, and to assess the relationship between the severity of PLH and the severity of clinical signs of EA; (4) to quantify an endoscopic signs of PLH and thus assess the PLH severity, and to introduce the computer-aided diagnostic (CAD) into the diagnosis of equine upper respiratory tract diseases.

The following research hypotheses were formulated: (1) PI and DDSP occur more frequently in horses with SEA than in those without SEA; (2) in horses with PI and DDSP, SEA is more severe than in horses without PI or DDSP; (3) successful treatment of SEA leads to improvement in the horse's clinical condition, both in terms of SEA symptoms and PI and DDSP symptoms; (4) PLH occurs more frequently in horses with EA than in horses without EA; (5) in horses with PLH, EA is more severe than in horses without PLH; (6) in horses with SEA, PLH is more severe than in horses with MEA; (7) endoscopic signs of the PLH can be quantified and computer-aided analyzed; (8) object detection-based processing technique of digital endoscopic images enables CAD of PLH severity.

The dissertation comprises four studies – one review study [P.1] and three research studies [P.2–P.4] – published in international scientific journals. The first study [P.1] focused of a review of the current literature on novel imaging techniques and pulmonary function tests applied in equine medicine. The subsequent three studies [P.2–P.4] were original research projects carried out between 2020 and 2025 on clinical cases at the Equine Clinic of the Warsaw University of Life Sciences. Study [P.2] was a prospective observational study. Horses enrolled in the study were diagnosed with SEA, and were exhibiting clinical symptoms (n = 46, 2020–2022). Medical history was



collected, and general and detailed respiratory examinations were performed. Resting and dynamic endoscopy of the upper and lower airways was conducted. Tracheal wash (TW) and bronchoalveolar lavage fluid (BALf) samples were obtained for cytological and bacteriological evaluation. Following standardized pharmacological treatment, procedures, including clinical examination and dynamic endoscopy, were repeated to assess treatment outcomes. Study [P.3] was a prospective observational study that included horses with suspected equine asthma ( $n = 81$ , 2020–2024). Each animal underwent standardized diagnostic procedures, including medical history, general and detailed respiratory examination, and resting endoscopy of both upper and lower airways. TW and BALf were obtained for cytological analysis. Based on combined clinical, endoscopic, and cytological findings, horses were classified as either healthy or affected by EA. Study [P.4] was a retrospective analytical study. Clinical records of warmblood horses ( $n = 70$ , 2022–2025) that underwent endoscopy due to respiratory symptoms or as part of a pre-purchase examination were analyzed. Inclusion criteria were age  $>5$  years, complete clinical documentation (general and detailed respiratory examination, PLH grading), and high-quality images of pharyngeal region.

The results confirmed most of the hypotheses. Specifically, 67.4% of horses with SEA exhibited palatal diseases (PI, DDSP). Following anti-inflammatory and bronchodilator treatment, no cases of PI were recorded, while DDSP persisted in four horses (8.7%), confirming the role of inflammation in the pathogenesis of these diseases [P.2]. PLH was more prevalent in horses with asthma than in those without, with more severe grades observed in younger horses. However, PLH was not found to directly influence the severity of clinical asthma symptoms [P.3]. In [P.4], digital endoscopic image analysis – including lymphoid follicle counts combined with clinical data – enabled effective classification of PLH. The developed model achieved high accuracy (0.76) and precision (0.83), outperforming models based solely on clinical data (0.43) or digital data (0.73). These findings highlight the significant potential of computer-assisted diagnostics in veterinary medicine. The use of machine learning algorithms and digital image processing not only enables objective assessment of endoscopic changes but also reduces the subjectivity associated with clinician experience. Moreover, such tools may allow for earlier detection of subtle inflammatory changes that could remain unnoticed in traditional examinations.

In conclusions, (1) advanced imaging modalities, including computed tomography (CT) and magnetic resonance (MR) imaging, together with pulmonary function tests (PTFs), significantly expand the diagnostic possibilities for equine respiratory diseases. However, their widespread clinical application remains limited and requires further research, validation, and the development of standardized clinical protocols. Therefore detailed clinical examination supported with the endoscopy – both resting and dynamic endoscopy – remains gold standard for the diagnosis of the upper and lower airways diseases; (2) the occurrence of PDs and the severity of clinical signs of respiratory disease are higher in horses with SEA before initiating pharmacological treatment than after its completion. Furthermore, SEA treatment reduces the incidence of PI, indicating a key role of the inflammatory process in the pathogenesis of EA and PDs. This supports the validity of anti-inflammatory pharmacotherapy as a first-line therapy in the treatment of upper and lower respiratory tract diseases in horses; (3) the occurrence of PLH is higher in horses with EA than in those without the disease and increases with the severity of EA, suggesting a potential association between the two diseases consistent with the "*one airway – one disease*" concept. However, PLH does not directly worsen the clinical signs of EA, although the amount of mucus in both the upper and lower respiratory tract increases with the severity of PLH; (4) the proposed digital image processing technique based on object detection allows for the quantification of endoscopic symptoms of PLH and the use of the obtained digital data in effective CAD of the disease. However, the accuracy of PLH staging increases with the inclusion of clinical data in the classifier model, indicating the need for the development of digital technologies in conjunction with the assessment of the patient's clinical condition. In summary, this dissertation demonstrates that the implementation of the "one airway – one disease" concept in equine medicine enables a broader and more integrated perspective on respiratory diseases. By combining clinical, imaging, and digital data, this approach enhances diagnostic accuracy, refines therapeutic strategies, and supports earlier detection of subtle pathological changes. The integration of this concept into equine practice strengthens the translational dimension of research, bridging knowledge and insights from human and veterinary medicine.

**Słowa kluczowe:** *equine asthma; palatal instability; dorsal displacement of soft palate; pharyngeal lymphoid hyperplasia; endoscopy; computer-aided diagnosis; Voronoi diagram*

## Wykaz skrótów

AI – *artificial intelligence* – sztuczna inteligencja

AR – *allergic rhinitis* – nieżytowe zapalenie nosa

BALf – *broncho-alveolar lavage fluid* – popłuczyny z przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej

CAD – *computer-aided diagnosis* – diagnostyka wspomagana komputerowo

CRS – *chronic rhinosinusitis* – przewlekłe zapalenie zatok przynosowych

CT – *computed tomography* – tomografia komputerowa

DDSP – *dorsal displacement of soft palate* – dogrzbietowe przemieszczenie podniebienia miękkiego

EA – *equine asthma* – astma koni

EAV – *equine arteritis virus* – wirusowe zapalenie tętnic koni

EHV – *equine herpesvirus* – herpeswirus koni

EIPH – *exercise-induced pulmonary hemorrhage* – powysiłkowe krwawienie z płuc

EIT – *electrical impedance tomography* – elektryczna tomografia impedancyjna

EIV – *equine influenza virus* – wirus grypy koni

FiO<sub>2</sub> – *fraction of inspired oxygen* – stężenie tlenu w mieszaninie oddechowej

FOS – *first-order statistics* – statystyki pierwszego rzędu

FVC – *forced vital capacity* – nasilona pojemność życiowa

GINA – Global Initiative for Asthma – Światowej Inicjatywy na rzecz Astmy

IOS – *impulse oscillometry* – oscylometria impulsowa

kNN – *k-nearest neighbors* – algorytm k najbliższych sąsiadów

LDA – *linear discriminant analysis* – liniowa analiza dyskryminacyjna

MEA – *mild-moderate equine asthma* – łagodna-umiarkowana astma koni

MR – *magnetic resonance* – rezonans magnetyczny

NC – *nasopharyngeal collapse* – zapadanie ściany nosogardzieli

NM – *nasopharyngeal mucus* – śluz w nosogardzieli

OSA – *obstructive sleep apnea* – obturacyjny bezdech senny

PDs – *palatal diseases* – choroby podniebienia

PEEP – *positive end–expiratory pressure* – dodatnie ciśnienie końcowo–wydechowe

PEF – *peak expiratory flow* – szczytowy przepływ wydechowy

PET – *positron emission tomography* – pozytronowa tomografia emisyjna

PFTs – *pulmonary function tests* – badania czynnościowe płuc

PI – *palatal instability* – niestabilność podniebienia miękkiego

PIF – *peak inspiratory flow* – szczytowy przepływ wdechowy

PLH – *pharyngeal lymphoid hyperplasia* – grudkowe zapalenie gardła

RF – *random forest* – las losowy

RLN – *recurrent laryngeal neuropathy* – neuropatia nerwu krtaniowego wstecznego

ROI – *region of interest* – obszar zainteresowania

RTG – *radiography* – badanie rentgenowskie

SEA – *severe equine asthma* – ciężka astma koni

SOS – *second order statistics* – statystyki drugiego rzędu

SVM – *support vector machine*, SVM – algorytm maszyny wektorów nośnych

TM – *tracheal mucus* – śluz w tchawicy

TW – *tracheal wash* – popłuczyny z tchawicy

UAD – *united airway disease* – koncept ujednoliconych dróg oddechowych

USG – *ultrasonography* – badanie ultrasonograficzne

VCD – *vocal cord dysfunction* – dysfunkcja fałdów głosowych

VT – *tidal volume* – objętość oddechowa

## Opis pracy

### 1. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Badania wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały szczegółowo przedstawione w zbiorze powiązanych tematycznie artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach z listy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW):

[P.1]. **Kozłowska N.**, Wierzbicka M., Jasiński T., Domino M. Advances in the diagnosis of equine respiratory diseases: a review of novel imaging and functional techniques. *Animals* 2022; 12(3): 381. (DOI: 10.3390/ani12030381) (Punkty MNiSW<sub>2022</sub> = 100, IF<sub>2022</sub> = 3,000).

[P.2]. **Kozłowska N.**, Wierzbicka M., Pawliński B., Domino M. Co-occurrence of severe equine asthma and palatal disorders in privately owned pleasure horses. *Animals* 2023; 13(12): 1962. (DOI: 10.3390/ani13121962) (Punkty MNiSW<sub>2023</sub> = 100, IF<sub>2023</sub> = 2,700).

[P.3]. **Kozłowska N.**, Wierzbicka M., Jasiński T., Domino M. Co-occurrence of equine asthma and pharyngeal lymphoid hyperplasia in pleasure horses. *Agriculture* 2024; 14(7): 1157. (DOI: 10.3390/agriculture14071157) (Punkty MNiSW<sub>2024</sub> = 100, IF<sub>2023</sub> = 3,300).

[P.4]. **Kozłowska N.**, Borowska M., Jasiński T., Wierzbicka M., Domino M. Computer-aided diagnosis of equine pharyngeal lymphoid hyperplasia using the object detection-based processing technique of digital endoscopic images. *Animals* 2025; 15(18): 2758. (DOI:10.3390/ani15182758) (Punkty MNiSW<sub>2025</sub> = 100, IF<sub>2023</sub> = 2,700).

Sumaryczny IF wynosi: 11,700.

Sumaryczna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi: 400.



## 2. Uzasadnienie podjęcia tematu pracy

### 2.1. Koncepcja „jedne drogi oddechowe – jedna choroba”

Koncepcja „*one airway – one disease*” (jedne drogi oddechowe – jedna choroba), określana także mianem wspólnej choroby dróg oddechowych (ang. *united airway disease*, UAD), odnosi się do związku pomiędzy chorobami górnych i dolnych dróg oddechowych u ludzi. U podstaw tej zależności leży anatomiczna, histologiczna i funkcjonalna integralność dróg oddechowych oraz wspólne mechanizmy zapalne (Giovannini–Chami i in., 2018). W medycynie ludzkiej badania epidemiologiczne i kliniczne wykazały zależność między astmą, a chorobami górnych dróg oddechowych takimi jak: nieżytowe zapalenie nosa (ang. *allergic rhinitis*, AR) (Acevedo–Prado i in., 2022; Bousquet i in., 2008), przewlekłe zapalenie zatok przynosowych (ang. *chronic rhinosinusitis*, CRS) przebiegające z obecnością lub bez obecności polipów (Bresciani i in., 2001; Fokkens i in., 2007), obturacyjnym bezdechem sennym (ang. *obstructive sleep apnea*, OSA) oraz dysfunkcją fałdów głosowych (ang. *vocal cord dysfunction*, VCD).

Najlepiej opisaną zależnością jest współwystępowanie astmy i AR. Stwierdzono, że około 80% pacjentów z astmą cierpi jednocześnie na AR, natomiast u 20–40% pacjentów z AR rozpoznaje się współwystępującą astmę (Settipane i in., 1994). Współwystępowanie chorób układu oddechowego ma istotne konsekwencje kliniczne, ponieważ AR zwiększa ryzyko rozwoju astmy oraz pogarsza przebieg kliniczny choroby osób już chorych na astmę (Bousquet i in., 2008).

Podobne wyniki uzyskano w odniesieniu do CRS. Astmę odnotowano u 2–38% pacjentów z CRS przebiegającym bez obecności polipów, u 2–66% pacjentów z CRS przebiegającym z obecnością polipów nosa oraz u 68–91% pacjentów z CRS opornym na leczenie (Batra i in., 2013). Współwystępowanie astmy i CRS wiąże się z gorszym rokowaniem, cięższym przebiegiem klinicznym astmy i CRS oraz zwiększoną ilością zaostrzeń astmy (Benninger & Holy, 2014; Håkansson i in., 2014).

Podobnie w populacji pacjentów chorych na astmę częstość występowania OSA wynosi 20–57%, (Madama i in., 2016; Taillé i in., 2016; Wang i in., 2016). W badaniach przeprowadzonych przez Julien i in. odsetek ten sięgał 88% badanych w przypadku ciężkiej astmy i 31% w przypadku astmy umiarkowanej. Dodatkowo wyższe wartości wskaźnika bezdechów i gorsza jakość snu związane były z nadmierną

sennością dzienną, u pacjentów z ciężką astmą w porównaniu do grupy kontrolnej (Julien i in., 2009).

W przypadku VCD udokumentowano współwystępowanie choroby z astmą u 16–50 % pacjentów (Newman i in., 1995). U tych pacjentów stwierdzono występowanie łuku odruchowego, w którym nadreaktywność oskrzeli wyzwała nadreaktywność krtani, która z kolei prowadzi do zaburzeń czynności strun głosowych (Parsons i in., 2010).

Według zaleceń Światowej Inicjatywy na rzecz Astmy (ang. *Global Initiative for Asthma*, GINA) (GINA, strategy report 2025, [ginasthma.org/2025-gina-strategy-report/](http://ginasthma.org/2025-gina-strategy-report/)), w przypadku diagnostyki astmy – szczególnie tej odpornej na leczenie – należy wykluczyć współistnienie przedstawionych chorób górnych dróg oddechowych, które mają znaczący wpływ na objawy kliniczne, częstotliwość występowania zaostrzeń oraz skuteczność leczenia astmy. Kompleksowe podejście terapeutyczne, uwzględniające leczenie współistniejących chorób górnych dróg oddechowych, stanowi kluczowy element poprawy efektywności leczenia i jakości życia pacjentów chorych na astmę.

## **2.2. Charakterystyka wybranych chorób układu oddechowego koni**

Choroby układu oddechowego, zaraz po chorobach układu mięśniowo-szkieletowego, stanowią drugą najczęstszą przyczynę ograniczenia wydolności wysiłkowej koni, która znacząco wpływa na ich zdrowie, dobrostan oraz użytkowość (Ainsworth & Hackett, 2004; Couëtil i in., 2016). Choroby układu oddechowego, ze względu na lokalizację, dzieli się na choroby górnych oraz dolnych dróg oddechowych. Choroby górnych dróg oddechowych obejmują zarówno stany zapalne, zmiany rozrostowe jak i zaburzenia czynnościowe.

Do najczęściej spotykanych chorób górnych dróg oddechowych koni należą: zapalenie zatok przynosowych – które może mieć charakter pierwotny (bakteryjny lub grzybiczy) bądź wtórny będący powikłaniem chorób zębów lub obecności torbieli zatokowej (Tremaine & Dixon, 2001) – a także postępujący krwiałak małżowiny sitowej – któremu towarzyszy zazwyczaj nawracające krwawienie z nozdrzy (Textor i in., 2012). Istotne miejsce wśród chorób górnych dróg oddechowych koni zajmują także choroby worków powietrznych – w tym bębica, ropniak, grzybica oraz nowotwory worków powietrznych, takie jak czerniak (Freeman, 2015). W obrębie gardła i krtani często diagnozuje się choroby zapalne takie jak grudkowe zapalenie gardła (ang.



*pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH). Odrębną grupę stanowią zaburzenia czynnościowe w obrębie nosogardzieli obejmujące: dogrzbietowe przemieszczenie podniebienia miękkiego (ang. *dorsal displacement of the soft palate*, DDSP), niestabilność podniebienia (ang. *palatal instability*, PI), zapadanie ściany nosogardzieli (ang. *nasopharyngeal collapse*, NC) czy neuropatię nerwu krtaniowego wstecznego (ang. *recurrent laryngeal neuropathy*, RLN). Zaburzenia czynnościowe nosogardzieli są jedną z głównych przyczyn nieprawidłowych szmerów oddechowych i ograniczenia wydolności wysiłkowej (Dixon i in., 2021). Kolejną grupę chorób górnych dróg oddechowych stanowią choroby infekcyjne. Wśród czynników bakteryjnych największe znaczenie kliniczne ma *Streptococcus equi subspecies equi* powodujący żoły. Żoły charakteryzują się wysoką zaraźliwością i możliwością powikłań ogólnoustrojowych (Sweeney i in., 2005). Równie istotne klinicznie są czynniki wirusowe, w tym wirus grypy koni (ang. *equine influenza virus*, EIV) (Paillot, 2014), herpeswirus koni (ang. *equine herpesvirus*, EHV) typu 1, 2 i 4 (Pusterla & Hussey, 2014), wirus zapalenia tętnic koni (ang. *equine arteritis virus*, EAV) (Balasuriya, 2014), adenowirusy, a także rinowirusy (Fripiat i in., 2025). Zakażenia te, ze względu na łatwość szerzenia się w populacjach koni, stanowią poważny problem epizootologiczny i gospodarczy, a ich rola w patogenezie wtórnych chorób bakteryjnych górnych i dolnych dróg oddechowych jest dobrze udokumentowana (Pusterla & Hussey, 2014).

Choroby dolnych dróg oddechowych koni obejmują zróżnicowaną grupę jednostek o etiologii zarówno infekcyjnej jak i nieinfekcyjnej (Ainsworth & Hackett, 2004). Szczególne znaczenie kliniczne ma bakteryjne i grzybicze zapalenie płuc, które często rozwija się wtórnie do zakażeń wirusowych, aspiracji lub zaburzeń mechanizmów obronnych dróg oddechowych (Ainsworth & Hackett, 2004). Choroby te mogą prowadzić do poważnych zaburzeń oddechowych przebiegających z gorączką, kaszlem, dusznością, które w wielu przypadkach mogą zagrażać życiu zwierzęcia. Ropnie płuc, powstające w wyniku przewlekłych zakażeń bakteryjnych, stanowią kolejne istotne wyzwanie diagnostyczne i terapeutyczne, ze względu na ich często podkliniczny przebieg oraz ograniczoną skuteczność leczenia (Roy & Lavoie, 2002). Z kolei zapalenie opłucnej, często będące następstwem zapalenia płuc lub uogólnionych zakażeń, wiąże się z nagromadzeniem wysięku w jamie opłucnej, silnym bólem, dusznością oraz złym rokowaniem (Ainsworth & Hackett, 2004). Tego rodzaju choroby nie tylko prowadzą do znacznego obniżenia wydolności wysiłkowej i dobrostanu koni,

ale również generują wysokie koszty leczenia i długotrwałej rekonwalescencji. Z uwagi na złożony charakter, wymagają one wczesnej diagnostyki opartej na dokładnym badaniu klinicznym, badaniu endoskopowym, dodatkowych badaniach obrazowych oraz analizie cytologicznej i mikrobiologicznej materiału pobranego z dolnych dróg oddechowych. Wśród chorób dolnych dróg oddechowych o podłożu nieinfekcyjnym szczególne znaczenie mają: astma koni (ang. *equine asthma*, EA) oraz powysiłkowe krwawienie z płuc (ang. *exercise-induced pulmonary hemorrhage*, EIPH). Patogeneza EIPH, szczególnie często obserwowanego u koni wyścigowych, nie została dotychczas w pełni wyjaśniona. Uważa się, że istotną rolę mogą odgrywać: zaburzenia wentylacji płuc spowodowane chorobami dróg oddechowych, mechaniczne ograniczenia wywierane przez narządy jamy brzusznej na grzbietowo–doogonowe pola płuc oraz uszkodzenia ścian naczyń włosowatych powstające w następstwie przeciążenia hemodynamicznego związanego z wysokim ciśnieniem transmuralnym naczyń włosowatych płuc (Ainsworth & Hackett, 2004). Konsekwencją EIPH może być nie tylko spadek wydolności wysiłkowej koni lecz także przewlekłe zmiany w mięszu płucnym prowadzące do dalszego pogłębiania zaburzeń oddechowych (Hinchcliff i in., 2008).

Choroby układu oddechowego koni stanowią zróżnicowaną grupę schorzeń, których wspólną cechą jest ograniczenie wydolności wysiłkowej i pogorszenie jakości życia zwierząt. Ich wysoka częstość występowania oraz duże znaczenie kliniczne sprawiają, że prawidłowa diagnostyka i zrozumienie mechanizmów patofizjologicznych są kluczowe w praktyce weterynaryjnej koni.

### **2.2.1. Astma koni**

EA jest najczęściej występującą chorobą dolnych dróg oddechowych koni (Rush & Mair, 2008). Jest to choroba przewlekła, progresywna, o znaczącym wpływie na przemysł jeździecki. Prowadzi ona do obniżenia wydolności wysiłkowej koni, pogorszenia jakości ich życia oraz wzrostu kosztów utrzymania i opieki weterynaryjnej. Dokładna etiologia EA wciąż pozostaje przedmiotem badań, ale przyjmuje się że choroba rozwija się w wyniku złożonej interakcji czynników genetycznych i środowiskowych (Couetil i in., 2020). EA charakteryzuje się przewlekłym zapaleniem dolnych dróg oddechowych, nadmierną produkcją wydzieliny w drogach oddechowych, nadreaktywnością oskrzeli prowadzącą do występowania epizodów skurczu oskrzeli oraz przebudową histologiczną dróg oddechowych (Couetil i in., 2020). Ze względu na

charakter objawów klinicznych wyróżnia się: łagodną – umiarkowaną astmę koni (ang. *mild-moderate equine asthma*, MEA) oraz ciężką astmę koni (ang. *severe equine asthma*, SEA) (Couetil i in., 2020). SEA występuje u około 14–17% populacji koni i stanowi postać aktywną klinicznie charakteryzującą się nawracającymi epizodami duszności przeplatanyymi z okresami remisji (Bullone & Lavoie, 2020; Couetil i in., 2016). Objawy kliniczne SEA są wyraźnie zaznaczone i obejmują: duszność, przyspieszony oddech, wypływ z nozdrzy, pracę tłoczni brzusznej i nietolerancję wysiłkową. Objawy te mogą wykazywać różne stopnie nasilenia. Z kolei MEA szacuje się, że występuje u 68–77% koni (Couetil i in., 2020). W badaniu przeprowadzonym u koni wyścigowych cytologia popłuczyn z przestrzeni pęcherzykowo-oskrzelowej (ang. *broncho-alveolar lavage*, BALf) wykazała obecność zmian charakterystycznych dla MEA u 80% badanych koni (Ivester i in., 2018; Wasko i in., 2011). Do objawów klinicznych MEA zalicza się nietolerancję wysiłkową oraz nawracający kaszel utrzymujący się co najmniej 3 tygodnie (Couetil i in., 2020). Poza tym konie nie wykazują innych objawów ze strony układu oddechowego, dlatego przypuszcza się, że MEA jest często niedodiagnozowana, zwłaszcza w populacji koni rekreacyjnych, u których wydolność wysiłkowa nie jest regularnie i szczegółowo monitorowana.

Podstawą prawidłowego rozpoznania EA jest szczegółowo zebrany wywiad, w którym ocenia się współwystępowanie typowych objawów takich jak: kaszel i pogorszenie wydolności wysiłkowej, oraz ocena ich zmienności i powtarzalności w czasie (Couetil i in., 2020). W badaniu klinicznym szczególną uwagę należy zwrócić na liczbę i typ oddechów, pracę tłoczni brzusznej, pracę nozdrzy, obecność wypływu z nozdrzy oraz głośność i charakter szmeru pęcherzykowego i tchawiczego. Złotym standardem w diagnostyce EA pozostaje badanie endoskopowe z pobraniem popłuczyn z tchawicy (ang. *tracheal wash*, TW) oraz BALf (Couetil i in., 2020). W przypadku zarówno MEA jak i SEA dochodzi do nadmiernego wydzielania śluzu w drogach oddechowych, które u koni wyścigowych może się utrzymywać od 3 do 9 tygodni (Wood i in., 2005), natomiast u koni rekreacyjnych może trwać miesiącami a nawet latami (Couetil i in., 2001a). Istnieją liczne doniesienia potwierdzające zależność między ilością śluzu w drogach oddechowych, a występowaniem kaszlu (Cardwell i in., 2014; Christley i in., 2001; Holcombe i in., 2006; Widmer i in., 2009). Dlatego w badaniu endoskopowym oprócz pobrania materiału do badania cytologicznego istotne znaczenie ma punktowa ocena nagromadzenia śluzu w tchawicy zestawiona w tabeli 1.

Tabela 1. Punktowa ocena nagromadzenia śluzu w tchawicy podczas badania endoskopowego.

| Parametr                  | Opis                                                                                 | Wynik |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------|
|                           | Brak                                                                                 | 0     |
|                           | Niewielka ilość, małe skupiska śluzu                                                 | 1     |
|                           | Umiarkowana ilość, większe skupiska śluzu                                            | 2     |
| Obecność śluzu w tchawicy | Zlewające się / tworzące strumień, śluz gęsty biało – żółty                          | 3     |
|                           | Znaczna ilość śluzu formująca „jeziorko,, przy wpuście tchawicy do klatki piersiowej | 4     |
|                           | Obfita ilość śluzu na całej długości tchawicy                                        | 5     |

EA charakteryzuje się neutrofilowym zapaleniem dróg oddechowych, dlatego cytologia BALf jest niezbędna do potwierdzenia wstępnego rozpoznania opartego na wynikach badania klinicznego i obrazie endoskopowym. Wykazano związek między zwiększonym odsetkiem neutrofili w BALf a spadkiem wydolności i nietolerancją wysiłkową (Courouce–Malblanc i in., 2010; Fraipont i in., 2011; Richard i in., 2009). U koni zdrowych odsetek neutrofili nie przekracza 5%, u koni z MEA mieści się w granicach 5–20%, natomiast u koni z SEA przekracza 20% (Couetil i in., 2020). Dodatkowo wykonanie TW, pozwala na ocenę nasilenia zapalenia w obrębie tchawicy. Wykazano również związek między odsetkiem neutrofili w TW, a występowaniem kaszlu. Nie potwierdzono jednak związku między odsetkiem neutrofili w TW, a wydolność wysiłkową koni (Christley i in., 2001). Nie stwierdzono również jednoznacznej zależności między wynikami BALf i TW, co sprawia, że TW nie może stanowić alternatywy dla cytologii BALf (Davis & Sheats, 2019). TW może jednak dostarczyć dodatkowych informacji i poszerzyć obraz toczącego się procesu zapalnego w drogach oddechowych m.in. o informacje czy proces zapalny ma podłoże bakteryjne albo czy EA jest wikłana bakteriami saprofitycznymi. Procentową ocenę zawartości neutrofili w BALf i TW w odniesieniu do nasilenia EA zestawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Procentowa ocena zawartości neutrofilii w popłuczynach z przestrzeni oskrzelowo-pęcherzykowej (ang. *broncho-alveolar lavage*, BALf) oraz popłuczynach z tchawicy (ang. *tracheal wash*) u koni zdrowych oraz u koni z astmą z uwzględnieniem: łagodnej-umiarkowanej astmy koni (ang. *mild-moderate equine asthma*, MEA) i ciężkiej astmy koni (ang. *severe equine asthma*, SEA).

| Parametr                         | Opis   | Wynik                              |
|----------------------------------|--------|------------------------------------|
| Zawartość %<br>neutrofili w BALf | <5%    | Prawidłowa                         |
|                                  | 5–20%  | MEA                                |
|                                  | >20%   | SEA                                |
| Zawartość %<br>neutrofilii w TW  | <20%   | Prawidłowa                         |
|                                  | 20–60% | Umiarkowane zapalenie neutrofilowe |
|                                  | >60%   | Ciężkie zapalenie neutrofilowe     |

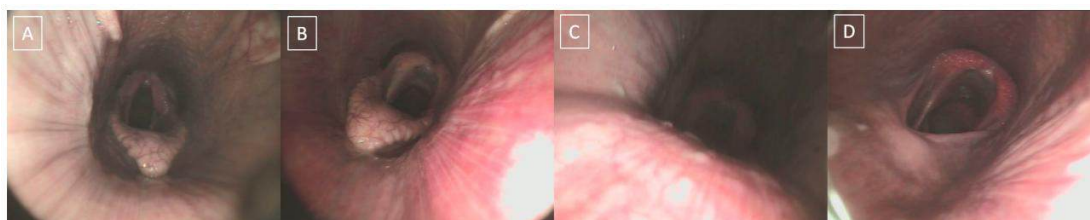
EA jest chorobą nieuleczalną. Długoterminowe postępowanie opiera się na zmianie warunków środowiskowych w celu ograniczenia narażenia na pył i inne czynniki wziewne nasilające chorobę, co w większości przypadków pozwala skutecznie zminimalizować częstość i stopień nasilenia objawów klinicznych. Leczenie farmakologiczne oparte jest o podaży kortykosteroidów – w celu ograniczenia procesu zapalnego oraz leków rozszerzających oskrzela i leków mukolitycznych – w celu poprawy wydolności oddechowej.

W przypadku diagnostyki różnicowej EA nie tylko powinno się różnicować astmę z innymi chorobami, ale również wziąć pod uwagę wysokie prawdopodobieństwo ich współwystępowania. Związek między astmą, a chorobami bakteryjnymi i wirusowymi nadal jest podmiotem badań, które wstępnie potwierdzają występowanie tej zależności (Cardwell i in., 2014; Fortier i in., 2013). W przypadku EIPH wyniki badań sugerują, że MEA może odgrywać istotną rolę w rozwoju tej choroby u młodych koni wyścigowych (McKane & Slocombe, 2010). Stany zapalne dróg oddechowych

oraz zmiany ciśnienia w ich obrębie zwiększają ryzyko uszkodzenia bariery pęcherzykowo–włosniczkowej, co może prowadzić do występowania krwawień do dróg oddechowych (Cook i in., 1988; McKane & Slocombe, 2010). Oznacza to również, że inne stany zapalne dróg oddechowych mogą wpływać na rozwój EIPH, ale nie jest to warunek konieczny (Ainsworth & Hackett, 2004). EA została również powiązana z występowaniem DDSP (Joó i in., 2021), PI i NC (Van Erck, 2011; Wysocka & Kluciński, 2018). Podłoże tej zależności nie jest w pełni poznane, jednak przypuszcza się, że istotną rolę odgrywa zwiększone ujemne ciśnienie związane z obturacją dolnych dróg oddechowych oraz rozprzestrzenianie się procesu zapalnego w obrębie dróg oddechowych (Joó i in., 2021).

### 2.2.2. Choroby podniebienia miękkiego

Choroby podniebienia (ang. *palatal diseases*, PDs) obejmują u koni przede wszystkim następujące choroby podniebienia miękkiego: DDSP oraz PI (Holcombe & Ducharme, 2007). DDSP polega na przemieszczeniu tylnej krawędzi podniebienia miękkiego nad nagłośnię co prowadzi do częściowego ograniczenia przepływu powietrza przez szparę głośni. Z kolei PI charakteryzuje się nadmiernym grzbietowo–brzusznym ruchem tylnej części podniebienia miękkiego, które podczas wysiłku prowadzi do ucisku lub spłaszczenia nagłośni (Holcombe & Ducharme, 2007). Obraz endoskopowy PDs z uwzględnieniem PI i DDSP przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Obrazy endoskopowe nosogardzieli podczas dynamicznego badania endoskopowego. Prawidłowa pozycja podniebienia i nagłośni (A); zapalenie błony śluzowej nosogardzieli (B); niestabilność podniebienia miękkiego (ang. *palatal instability*, PI) – widoczna uniesiona tylna część podniebienia miękkiego zmniejszająca widoczność nagłośni (C); dogrzbietowe przemieszczenie podniebienia miękkiego (ang. *dorsal displacement of soft palate*, DDSP) – tylna krawędź podniebienia przykrywa nagłośnię (D) (Kozłowska i in., 2023).

PI często uznawana jest za etap przejściowy w rozwoju DDSP, choć PI może występować również jako samodzielne zaburzenie, a DDSP może występować bez wcześniejszego stwierdzenia PI. DDSP może mieć charakter napadowy pojawiający się epizodycznie lub charakter trwały. Ostateczne rozpoznanie opiera się na wykonaniu dynamicznego badania endoskopowego (Barakzai & Hawkes, 2010). W obu przypadkach objawy kliniczne mogą obejmować zmniejszenie wydolności wysiłkowej konia, nietypowe szmery oddechowe słyszalne podczas ruchu oraz kaszel (Barakzai & Hawkes, 2010). PDs mogą wystąpić u każdego konia, jednak częściej diagnozowane są u koni wyścigowych oraz ujeżdżeniowych. Do potencjalnych czynników etiologicznych PDs zalicza się: dysfunkcję nerwów (nerwu błędnego i nerwu podjęzykowego), dysfunkcję mięśnia gnykowo-tarczowego (Cheetham i in., 2009; Ducharme i in., 2003; Holcombe i in., 1998), wrodzone lub nabyte wady anatomiczne (np. deformację nagłośni, torbiele, nowotwory) (Holcombe & Ducharme, 2007) oraz choroby zapalne nosogardzieli (Couroucé i in., 1999; Holcombe & Ducharme, 2007; Holcombe i in., 2010).

### **2.2.3. Grudkowe zapalenie gardła**

PLH jest chorobą górnych dróg oddechowych objawiającą się zapaleniem błony śluzowej oraz powiększeniem grudek chłonnych nosogardzieli (Holcombe & Ducharme, 2007). Grudki chłonne nosogardzieli stanowią zgrupowaną tkankę limfatyczną i są istotną częścią lokalnego układu odpornościowego, pełniąc funkcję pierwszej linii obrony przeciwko infekcjom wirusowym i bakteryjnym oraz działaniu czynników drażniących obecnym w środowisku zewnętrznym (Holcombe & Ducharme, 2007; Sullivan & Parente, 2003; Tessier, 2006). W odpowiedzi na bodźce drażniące błonę śluzową nosogardzieli dochodzi do wzmożonej aktywności immunologicznej lokalnej tkanki limfatycznej, czego następstwem jest pojawienie się grudek o zróżnicowanej charakterystyce i liczbie – zależnej od nasilenia stanu zapalnego (Holcombe & Ducharme, 2007).

U młodych koni (< 5. roku życia) PLH jest uznawana za fizjologiczny samoograczający się etap rozwoju układu odpornościowego górnych dróg oddechowych (Holcombe & Ducharme, 2007). PLH klasyfikuje się na podstawie objawów klinicznych oraz obrazu endoskopowego błony śluzowej nosogardzieli w skali od 0 do 4, w której 0 oznacza brak zmian, a 4 wskazuje na ciężką postać PLH (Holcombe & Ducharme, 2007). Saulez i Gummow stwierdzili występowanie PLH

w stopniu 2–4 u 63% koni pełnej krwi angielskiej, przy czym u młodszych osobników częściej obserwowano zmiany w stopniu 3–4 (Sauledz & Gummow, 2009). Z kolei Hobo i in. stwierdzili występowanie PLH w stopniu 3–4 u 37% 2-letnich koni wyścigowych i zaobserwowali, że występowanie PLH spadło niemal do zera u koni powyżej 6. roku życia (Hobo i in., 1995). Co istotne, u młodych koni rozwój PLH często zbiega się w czasie z rozpoczęciem treningów i kariery sportowej (Holcombe & Ducharme, 2007). Większość autorów podkreśla, że nasilenie PLH nie wpływa bezpośrednio na wydolność wysiłkową koni (Hobo i in., 1995; Holcombe i in., 2006; Sauledz & Gummow, 2009), choć u części zwierząt mogą pojawić się objawy takie jak nietypowe szmery oddechowe, kaszel czy krwawienia z nozdrzy (Holcombe & Ducharme, 2007). Objawy kliniczne PLH pozostają jednak niespecyficzne i mogą występować również przy wielu innych chorobach dróg oddechowych. Diagnostyka PLH opiera się głównie na spoczynkowym badaniu endoskopowym, podczas którego ocenia się stopień rozrostu grudek chłonnych oraz ilość śluzu w obrębie nosogardzieli (rycina 2, tabela 3) (Koblinger i in., 2011; Kozłowska i in., 2024).



Rycina 2. Obrazy endoskopowe ściany gardła podczas spoczynkowego badania endoskopowego z uwzględnieniem stopni nasilenia grudekowego zapalenia gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH). Stopień 0 PLH – brak widocznych grudek limfatycznych (A); stopień 1 PLH – kilka małych grudek limfatycznych widocznych na dogrzbietowej ścianie gardła (B); stopień 2 PLH – liczne małe grudki limfatyczne widoczne na dogrzbietowej i bocznej ścianie gardła (C); stopień 3 PLH – liczne duże, hiperemiczne grudki limfatyczne na dogrzbietowej i bocznej ścianie gardła (D); stopień 4 PLH – liczne duże, obrzęknięte i hiperemiczne grudki limfatyczne tworzące polipowate agregaty na dogrzbietowej i bocznej ścianie gardła (E).



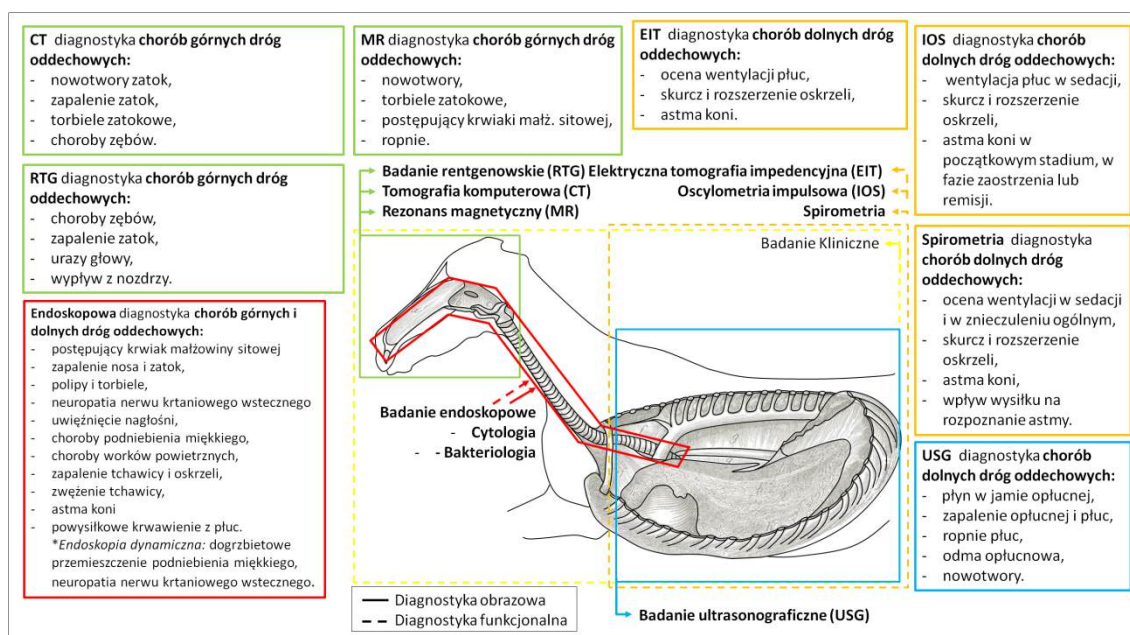
Tabela 3. Punktowa ocena nagromadzenia śluzu w nosogardzieli podczas badania endoskopowego.

| Parametr                 | Opis                                                                                                 | Wynik |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
|                          | Brak widocznego śluzu                                                                                | 0     |
| Obecność                 | Widoczne małe grudki śluzu bocznie i dobrzusznie od nagłośni                                         | 1     |
| śluzu w<br>nosogardzieli | Widoczna większa ilość śluzu tworząca skupiska umiejscowione dobrzusznie i dogrzebietowo od nagłośni | 2     |
|                          | Duża ilość gęstego śluzu niezależnie od lokalizacji                                                  | 3     |

### 2.3. Charakterystyka metod diagnostycznych chorób układu oddechowego koni

Podstawowa diagnostyka chorób układu oddechowego koni opiera się na szczegółowym wywiadzie, badaniu klinicznym oraz badaniu endoskopowym połączonym z pobraniem materiału do badań laboratoryjnych z wykorzystaniem procedur BALf i TW (Ainsworth & Hackett, 2004). Dodatkowo pomocne są badania obrazowe, takie jak badanie ultrasonograficzne (ang. *ultrasonography*, USG) czy badanie rentgenowskie (ang. *radiography*, RTG). Obecność podklinicznych postaci chorób układu oddechowego, które w przyszłości mogą negatywnie wpływać na osiągi sportowe i użytkowość koni, podkreśla potrzebę poszukiwania metod umożliwiających ich rozpoznanie jeszcze przed pojawieniem się objawów klinicznych. Do takich metod zaliczają się badania czynnościowe płuc (ang. *pulmonary function tests*, PFTs) obejmujące m.in. spirometrię (Burnheim i in., 2016), elektryczną tomografię impedancyjną (ang. *electrical impedance tomography*, EIT) (Ambrisko i in., 2015; Moens i in., 2013) oscylometrię impulsową (ang. *impulse oscillometry*, IOS) (Erck i in., 2010) czy pletyzmografię (Hyatt i in., 2014). Badania te pozwalają na ocenę parametrów funkcjonalnych układu oddechowego oraz wykrycie wczesnych zaburzeń wymiany gazowej, które mogą pozostawać niewidoczne w standardowym badaniu klinicznym i badaniu endoskopowym. Choć wyniki dotychczasowych badań są obiecujące, zastosowanie PETs w medycynie weterynaryjnej koni pozostaje obecnie ograniczone głównie do dużych ośrodków naukowych. Warto wspomnieć również o nowoczesnych technikach obrazowania, takich jak tomografia komputerowa (ang.

computed tomography, CT) i rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance*, MR), które dostarczają cennych informacji na temat przestrzennych warunków anatomicznych oraz objawów radiologicznych wielu chorób. Jednak ich użycie w diagnostyce chorób układu oddechowego koni jest w znacznym stopniu ograniczone – przez rozmiar gantry – do obrazowania okolicy głowy i szyi koni (Arencibia i in., 2020; Fitz & Gerhards, 2005). Wykorzystanie metod diagnostycznych w ocenie objawów wybranych choroby układu oddechowego koni zestawiono na rycinie 3.



Rycina 3. Zastosowanie metod diagnostycznych w ocenie objawów wybranych chorób poszczególnych odcinków układu oddechowego koni. Badanie rentgenowskie (ang. *radiography*, RTG), tomografia komputerowa (ang. *computed tomography*, CT), rezonans magnetyczny (ang. *magnetic resonance*, MR); elektyczna tomografia impedancyjna (ang. *electrical impedance tomography*, EIT), oscylometria impulsowa (ang. *impulse oscillometry*, IOS), badanie ultrasonograficzne (ang. *ultrasonography*, USG).

### 2.3.1. Wywiad i badanie kliniczne

Niezmiennym elementem każdego protokołu badania konia podejrzanego o występowanie chorób układu oddechowego jest dokładny wywiad oraz badanie kliniczne. Wywiad dostarcza istotnych informacji dotyczących użytkowania, warunków

utrzymania i stanu zdrowia zwierzęcia – w tym przebytych chorób, stosowanych leków i reakcji na leczenie, a także objawów ze strony układu oddechowego – ich charakteru (m.in. występowania w spoczynku, w ruchu, i/lub po wysiłku), czasu trwania i częstotliwości występowania. Kluczowe znaczenie mają również warunki środowiskowe, takie jak wentylacja stajni, rodzaj ściółki czy dostęp do pastwiska, których udział jest istotny w patogenezie niektórych chorób układu oddechowego. Już na tym etapie lekarz weterynarii może wstępnie ocenić, czy ma do czynienia z chorobą ostrą czy przewlekłą. Informacje uzyskane podczas wywiadu są także niezbędne do opracowania planu leczenia oraz zaleceń dotyczących warunków środowiskowych w których przebywa koń (Couëtil i in., 2016).

Przed przystąpieniem do badania klinicznego zaleca się obserwację zwierzęcia z daleka. Pozwala to na obiektywną ocenę liczby oddechów w spoczynku oraz pracy nozdrzy i tłoczni brzusznej, które w warunkach stresu lub niepokoju mogą być zawyżone. Następnie – w ramach badania klinicznego – wykonuje się pomiar temperatury wewnętrznej ciała i częstości skurczów serca oraz ocenę węzłów chłonnych i błon śluzowych. Szczegółowe badanie układu oddechowego obejmuje m.in. osłuchiwanie okolicy krtani, tchawicy i płuc (Couëtil i in., 2016). Wybrane objawy kliniczne uchwytnie w szczegółowym badaniu układu oddechowego koni przedstawiono na rycinie 4. Poszczególne etapy badania klinicznego układu oddechowego koni – wraz z ilościową oceną ich wyników przy użyciu zmodyfikowanego systemu punktowego (Lavoie i in., 2019) – zestawiono w tabeli 4.



Rycina 4. Wybrane objawy kliniczne uchwytnie w szczegółowym badaniu układu oddechowego koni. Gęsty śluzowy wypływ z nozdrzy (A); rozszerzenie nozdrzy (B); dobrze zarysowana rynienka brzuszna powstała w wyniku hipertrofii mięśni oddechowych na skutek przewlekłej obturacji dolnych dróg oddechowych (C).

Tabela 4. Punktowa ocena wyników badania klinicznego układu oddechowego koni.

| Parametr                  | Opis                                                                          | Wynik |
|---------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Liczba oddechów           | <16 / minutę                                                                  | 0     |
|                           | 17–20 / minutę                                                                | 1     |
|                           | 21–30 / minutę                                                                | 2     |
|                           | >30 / minutę                                                                  | 3     |
| Wydzielina z<br>nozdrzy   | Brak                                                                          | 0     |
|                           | Surowicza/śluzowa                                                             | 1     |
|                           | Ropno–śluzowa/krwotok                                                         | 2     |
| Osluchiwanie<br>tchawicy  | Prawidłowy szmer tchawiczy                                                    | 0     |
|                           | Wzmoczony szmer tchawiczy                                                     | 1     |
|                           | Wyraźnie nasilony                                                             | 2     |
|                           | Obecne rżenia i świsty                                                        | 3     |
| Osluchiwanie płuc         | Prawidłowy szmer pęcherzykowy                                                 | 0     |
|                           | Wzmoczony szmer pęcherzykowy                                                  | 1     |
|                           | Wyraźnie nasilony szmer pęcherzykowy                                          | 2     |
|                           | Obecne rżenia i świsty                                                        | 3     |
| Ruch nozdrzy              | Brak                                                                          | 0     |
|                           | Obecny                                                                        | 1     |
| Kaszel                    | Brak                                                                          | 0     |
|                           | Kaszel w określonych sytuacjach (podczas karmienia, wymiany ściółki, wysiłku) | 1     |
|                           | Częsty kaszel                                                                 | 2     |
| Praca tłoczni<br>brzuszej | Brak                                                                          | 0     |
|                           | Widoczna lekko zarysowana praca tłoczni brzusznej                             | 1     |
|                           | Wyraźna praca tłoczni, obecna „rynienka oddechowa”                            | 2     |

### 2.3.2. Badanie endoskopowe

Badanie endoskopowe stanowi złoty standard w diagnostyce chorób układu oddechowego koni, ponieważ umożliwia bezpośrednią wizualizację poszczególnych

odcinków dróg oddechowych oraz pobranie materiału do dalszych badań laboratoryjnych. Podczas badania endoskopowego możliwe jest wykonanie biopsji i pobranie materiału do badania cytologicznego i bakteriologicznego (Couetil i in., 2001a; Lee i in., 2022). Badanie endoskopowe może mieć również zastosowanie terapeutyczne. Wykorzystuje się ją m.in. do usuwania ciał obcych, ostrzykiwania progresywnego krwaka małżowiny sitowej czy płukania worków powietrznych (Ainsworth & Hackett, 2004).

W praktyce klinicznej, badanie endoskopowe górnych dróg oddechowych znajduje najczęstsze zastosowanie w diagnostyce RLN, PI, DDSP oraz chorób worków powietrznych (Ainsworth & Hackett, 2004). Podczas badania endoskopowego ocenia się także tchawicę pod kątem obecności i rodzaju wydzieliny oraz występowania wad anatomicznych, np. zwężeń. Z kolei ocena dużych oskrzeli pozwala na identyfikację stanu zapalnego i charakterystykę wydzieliny obecnej w ich świetle (Ainsworth & Hackett, 2004).

### **2.3.3. Badanie ultrasonograficzne**

USG stanowi cenne uzupełnienie badania klinicznego układu oddechowego koni, ponieważ jest metodą łatwą w użyciu, bezpieczną i stosunkowo niedrogą. USG umożliwia wykrycie nawet niewielkich ilości płynu w jamie opłucnej, a także ocenę jego objętości i charakteru (Marr, 1993). Dzięki temu USG pozwala na szybkie rozpoznanie zmian, które mogą pozostać nieuchwytne w badaniu klinicznym i niewidoczne w RTG (Lo Feudo i in., 2021).

Ograniczeniem USG jest możliwość oceny jedynie powierzchniowych okołopłucnowych obszarów płuc, bez możliwości dokładnego różnicowania objawów chorób układu oddechowego pod kątem ich etiologii. Mimo to metoda ta odgrywa istotną rolę w diagnostyce wielu chorób układu oddechowego koni, takich jak pleuropneumonia, zapalenie opłucnej, ropnie, odma opłucnowa czy zmiany nowotworowe (Ainsworth & Hackett, 2004).

USG znajduje również zastosowanie w procedurach interwencyjnych, m.in. przy pobieraniu płynu z jamy opłucnej czy podczas biopsji płuc. Dodatkowo wykorzystanie techniki dopplerowskiej umożliwia ocenę unaczynienia zmian zlokalizowanych w obrębie ściany klatki piersiowej, szyi oraz przestrzeni opłucnowej, co zwiększa precyzję diagnostyki i pozwala na lepsze różnicowanie procesów zapalnych

i nowotworowych (Morresey, 2014). Dzięki swojej dostępności, bezpieczeństwu oraz dużej wartości diagnostycznej, USG stanowi nieodzowny element współczesnej diagnostyki chorób układu oddechowego koni, szczególnie w połączeniu z innymi metodami obrazowania, takimi jak badanie endoskopowe czy RTG.

#### **2.3.4. Badanie rentgenowskie**

RTG jest szeroko dostępną, przenośną, stosunkowo niedrogą i dobrze tolerowaną przez konie metodą diagnostyczną, możliwą do wykonania zarówno w warunkach terenowych, jak i klinicznych. Odgrywa ono istotną rolę w diagnostyce chorób górnych dróg oddechowych, szczególnie w obrębie twarzoczaszki, jamy nosowej i zatok przynosowych. Najszersze zastosowanie RTG znajduje w ocenie chorób zębów i zatok, które są częstą przyczyną przewlekłych objawów ze strony górnych dróg oddechowych (Ainsworth & Hackett, 2004; Dixon i in., 2021; Tremaine & Dixon, 2001). RTG umożliwia wykrycie zmian takich jak: ropnie okołowierzchołkowe, zapalenie zatok przynosowych, niedrożność przewodów nosowych czy deformacje kostne (Tremaine & Dixon, 2001). Ze względu jednak na skomplikowaną anatomię twarzoczaszki konia i nakładanie się struktur anatomicznych interpretacja radiogramów może być utrudniona. W takich przypadkach RTG często stanowi punkt wyjścia do dalszej diagnostyki obrazowej z wykorzystaniem CT (Tremaine & Dixon, 2001). W ocenie płuc, RTG może być pomocne przy diagnostyce zagęszczeń śródmiąższowych – charakterystycznych dla zapaleń płuc, odczynu okołoskrzelowego – związanego z zapaleniami dróg oddechowych, ubytków powietrzności – w przebiegu nowotworów, przerzutów czy przewlekłych zakażeń oraz płynu w jamie opłucnej widocznego na granicy płucno–przeponowej (Dunkel i in., 2013). Należy jednak podkreślić, że u koni uzyskanie dobrej jakości radiogramów klatki piersiowej jest dużym wyzwaniem ze względu na rozmiary zwierzęcia, ograniczone przenikanie promieniowania rentgenowskiego przez tkanki oraz wielkość i moc aparatów rentgenowskich i kaset radiologicznych/detektorów (Dunkel i in., 2013).

#### **2.3.5. Tomografia komputerowa**

CT jest zaawansowaną metodą obrazowania, która znalazła szerokie zastosowanie w szczegółowej ocenie struktur anatomicznych głowy oraz kończyn koni. Jest to metoda coraz szerzej dostępna – i dzięki dostępności dedykowanych tomografów umożliwiających przeprowadzenie badania w pozycji stojącej – coraz bardziej

bezpieczne. Badanie CT polega na wykonywaniu serii warstwowych zdjęć przy użyciu rotacyjnej, silnie skondensowanej wiązki promieniowania rentgenowskiego, co pozwala na uzyskanie dwuwymiarowych tomogramów rekonstruowalnych do postaci trójwymiarowych rekonstrukcji objętościowych (Hathcock & Stickle, 1993).

CT jest wykorzystywane głównie w obrazowaniu struktur kostnych oraz przestrzeni powietrznych. Podanie środka kontrastowego zwiększa możliwości różnicowania zmian w tkankach miękkich, co istotnie podnosi wartość diagnostyczną badania (Crijns i in., 2016). CT umożliwia uzyskanie obrazów o bardzo wysokiej jakości i rozdzielczości oraz trójwymiarową rekonstrukcję badanych struktur anatomicznych co znajduje zastosowanie w planowaniu leczenia – w tym zabiegów chirurgicznych – zwłaszcza w przypadkach postępujących chorób, w których precyzyjne określenie rozległości zmian decyduje o rokowaniu (Witte & Perkins, 2011; Zakia i in., 2021). Przykładowo, badanie CT jest wykorzystywane w diagnostyce i planowaniu leczenia chirurgicznego torbieli zatokowych (Fenner i in., 2019; Ostrowska i in., 2020). W literaturze opisano zastosowanie CT m.in. w diagnostyce nowotworów jamy nosowej i zatok przynosowych (Cilliers i in., 2008; Cissell i in., 2012; De Zani i in., 2011; Fenner i in., 2019; Henninger i in., 2003; Strohmayer i in., 2020), zapalenia zatok (Henninger i in., 2003), zapalenia zębodołów (Henninger i in., 2003) oraz w ropniaka worków powietrznych (Solano & Brawer, 2004).

U źrebiąt i mniejszych koni istnieje możliwość obrazowania tomograficznego klatki piersiowej i dolnych dróg oddechowych z wykorzystaniem większości dostępnych tomografów komputerowych (Schliewert i in., 2015). Głównym ograniczeniem tej metody pozostaje jednak wielkość pacjenta. W przypadku dużych koni średnica gantry ludzkich tomografów adaptowanych do badania koni uniemożliwia pełne obrazowanie klatki piersiowej czy jamy brzusznej. Jest ono natomiast możliwe w wysokorozdzielczych tomografach wiązki wachlarzowej dedykowanych dla koni – wyposażonych w ruchome gantry o większej średnicy. Dodatkowym utrudnieniem obrazowania tomograficznego jest konieczność znieczulenia ogólnego do badania głowy i dogłowego odcinka szyi w ludzkich tomografach adaptowanych na potrzeby koni oraz badania doogonowego odcinka szyi i klatki piersiowej w wysokorozdzielczych tomografach dedykowanych dla koni. W takich przypadkach znieczulenie ogólne zwiększa ryzyko związane z badaniem. Obrazowanie głowy i doogonowego odcinka szyi w wysokorozdzielczych tomografach dedykowanych dla

koni jest możliwe po sedacji w pozycji stojącej. Pomimo tych ograniczeń, CT znajduje coraz szersze zastosowanie jako badanie dodatkowe, szczególnie w sytuacjach, w których RTG czy badanie endoskopowe nie dostarczają wystarczających informacji diagnostycznych (Tucker & Farrell, 2001).

### **2.3.6. Rezonans magnetyczny**

MR stanowi zaawansowaną metodę obrazowania, która podobnie jak CT, umożliwia uzyskanie przekrojowych obrazów głowy i kończyn koni. W przeciwieństwie do CT, MR wyróżnia przydatność w obrazowaniu tkanek miękkich, co czyni tę metodę szczególnie przydatną w ocenie obrzęków oraz zmian zapalnych i rozrostowych. Zastosowanie wysokopoleowego obrazowania metodą MR w medycynie weterynaryjnej koni jest jednak ograniczone przez małą średnicę gantry dostępnych ludzkich aparatów adaptowanych do badania koni, brak wysokopoleowych aparatów dedykowanych dla koni oraz konieczność umieszczenia badanej części ciała w centrum pola magnetycznego (Tucker & Farrell, 2001). Z tego powodu pełne obrazowanie głowy możliwe jest jedynie u kuców, źrebiąt lub w obrębie przedniej części głowy koni, i wymaga zastosowania znieczulenia ogólnego. Alternatywę dla klasycznych aparatów wysokopoleowych stanowią systemy niskopoleowe, które umożliwiają wykonywanie badań u koni po sedacji w pozycji stojącej. Rozwiązanie to znacząco obniża ryzyko związane ze znieczuleniem ogólnym i zwiększa bezpieczeństwo badania, a jednocześnie pozwala na uzyskanie obrazów o jakości wystarczającej do diagnostyki wielu schorzeń. Należy jednak podkreślić, że dostępne systemy niskopoleowe są w większości przypadków wyspecjalizowane do obrazowania obwodowego odcinka kończyn, co znacznie ogranicza a nawet uniemożliwia obrazowanie w nich struktur głowy (Fitz & Gerhards, 2005; Gutierrez–Nibeyro i in., 2020). Z tego względu większość badań koni z wykorzystaniem MR koncentruje się na diagnostyce chorób aparatu ruchu (Waselau i in., 2020; Zani i in., 2018). Obrazowanie głowy metodą MR wykonywane jest znacznie rzadziej, choć literatura wskazuje na coraz większe znaczenie MRI w diagnostyce chorób neurologicznych (Ferrell i in., 2002, Spoormakers i in., 2010) oraz chorób układu oddechowego (Manso–Díaz i in., 2015). Manso–Díaz i in. przeprowadzili obrazowanie metodą MR 84 koni, w którym precyzyjnie określili lokalizację i rozmiar zmian, a także ich relację do sąsiadujących struktur głowy. W tej pracy, wśród diagnozowanych chorób układu oddechowego znalazły się m.in.: zapalenie zatok przynosowych, choroby zębów, zmiany rozrostowe w jamie nosowej,



skrzywienie przegrody nosowej oraz progresywny krwihak małżowiny sitowej (Manso–Díaz i in., 2015). Tessier i in. potwierdzili przydatność obrazowania metodą MR w rozpoznawaniu zapalenia i torbieli zatok przynosowych, progresywnego krwiała małżowiny sitowej oraz nowotworów jamy nosowej (Tessier i in., 2013). Z kolei Garrett i in. opisali zastosowanie tej metody obrazowania w diagnostyce chorób krtani i gardła (Garrett, 2012; Garrett i in., 2009, 2010).

### **2.3.7. Badania czynnościowe płuc**

PFTs stanowią obiecującą metodę diagnostyczną umożliwiającą ocenę funkcji układu oddechowego. W przeciwieństwie do standardowych metod obrazowania – które pozwalają na bezpośrednią wizualizację struktur anatomicznych i identyfikację diagnozowanych zmian – PFTs dostarczają informacji o stanie funkcjonalnym układu oddechowego – przede wszystkim oskrzeli i płuc. U ludzi, badania te są pomocne w diagnostyce wielu chorób układu oddechowego – przede wszystkim chorób obturacyjnych (m.in. astmy, mukowiscydozy i rozedmy oskrzeli), w przebiegu których dochodzi do zmniejszenia przepływu powietrza w płucach wskutek zwężenia dróg oddechowych, oraz chorób restrykcyjnych (m.in. gruźlicy, sarkoidozy i włóknienia płuc), w przebiegu których dochodzi do zmniejszenia powierzchni czynnościowej płuc.

W medycynie weterynaryjnej koni, badania czynnościowe układu oddechowego można przeprowadzić z wykorzystaniem następujących procedur diagnostycznych: spirometrii, IOS i EIT (Burnheim i in., 2016; Erck i in., 2010; Moens i in., 2013). Pozwalają one na ocenę sprawności wentylacyjnej płuc, pojemności płuc, wielkości przepływu powietrza w drogach oddechowych, reakcji dróg oddechowych na czynniki drażniące, sprawności wymiany gazowej oraz wielkości oporu oddechowego (Auer i in., 2018; Burnheim i in., 2016; Erck i in., 2010). Choroby układu oddechowego często powodują zaburzenia wymiany gazowej, co obiektywnie przejawia się pogorszeniem mechaniki oddychania i spadkiem wentylacji. Dzięki temu PFTs, jako metody nieinwazyjne, znajdują zastosowanie w diagnostyce, monitorowaniu przebiegu oraz ocenie skuteczności leczenia chorób układu oddechowego. Mogą również być wykorzystywane we wspomaganiu podejmowania decyzji terapeutycznych (Hyatt i in., 2014). Należy jednak podkreślić, że same wyniki PETs nie prowadzą do postawienia pełnej diagnozy klinicznej. Ich interpretacja wymaga odniesienia do wywiadu, badania klinicznego i wyników badań obrazowych.

Wprowadzenie PFTs do medycyny weterynaryjnej koni przyniosło znaczący postęp w ocenie wydolności oddechowej zdrowych koni sportowych oraz wydolności oddechowej chorych koni niezależnie od ich użytkowania (Burnheim i in., 2016; Erck i in., 2010; Herteman i in., 2021). Jednak wciąż konieczne są dalsze badania w celu określenia wartości referencyjnych wyników PFTs koni, które umożliwią klasyfikowanie koni jako zdrowe i chore (Hoffman, 2008).

#### **2.3.7.1. Spirometria**

Spirometria jest badaniem czynnościowym układu oddechowego, które mierzy objętość i pojemność płuc, a także prędkość przepływu powietrza w drogach oddechowych. U ludzi jest ona szeroko wykorzystywana we wczesnym rozpoznawaniu oraz monitorowaniu leczenia przewlekłych chorób obturacyjnych – takich jak astma (Vogelmeier i in., 2017). W spirometrii wykorzystuje się maski twarzowe wyposażone w czujniki przepływu, które rejestrują każdy wdech i wydech z wysoką dokładnością. Analizowane są parametry takie jak: objętość oddechowa (ang. *tidal volume*, VT), częstość oddechów, szczytowy przepływ wdechowy (ang. *peak inspiratory flow*, PIF), szczytowy przepływ wydechowy (ang. *peak expiratory flow*, PEF), czas do osiągnięcia przepływu szczytowego i nasiloną pojemność życiowa (ang. *forced vital capacity*, FVC) (Barreiro & Perillo, 2004). Spirometria polega na wykonaniu pełnego wdechu, a następnie szybkiego i maksymalnego wydechu. U koni takie wymuszone badanie jest jednak utrudnione, dlatego stosowano znieczulenia ogólnego, aby wyeliminować wpływ świadomej kontroli oddechu na opróżnianie płuc (Leith, 1976).

Pierwsze badania spirometryczne koni dotyczyły ewaluacji krzywej spirometrycznej w warunkach spoczynkowych u zdrowych koni (Art i in., 1990; Guthrie i in., 1995). Connally i Derksen opisali krzywą spirometryczną u koni zdrowych oraz koni z EA podczas wysiłku na bieżni mechanicznej i nie stwierdzili istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami (Connally & Derksen, 1994). Późniejsze badania wykazały jednak, że u koni z EA występują odmienne strategie oddychania, w tym m.in. zanik charakterystycznego dwufazowego wzorca przepływu powietrza (Herholz i in., 2003; Petsche i in., 1994). Herholtz i in. podkreślili wpływ rodzaju wykonywanej pracy na zdolność różnicowania stopnia EA z wykorzystaniem spirometrii. Autorzy wykazali, że wysiłek może maskować charakterystyczne dla EA odchylenia krzywej spirometrycznej (Herholz i in., 2003). Burnheim i in. stwierdzili, że wyniki spirometrii cechują się dużą zmiennością między kolejnymi dniami, natomiast

w obrębie jednorazowego badania pozostają wysoce powtarzalne (Burnheim i in., 2016). Spirometrię wykorzystano także do oceny wpływu środków farmakologicznych na czynność płuc. Raidal i in. udowodnili, że ksylazyna i acepromazyna wyraźnie obniżają parametry oddechowe, natomiast salbutamol nie wpływał istotnie na ich wartości – poza obserwowanym wzrostem przepływu szczytowego (Raidal i in., 2017). Z kolei Moens wykazał przydatność spirometrii w monitorowaniu głębokości znieczulenia u koni poddawanych znieczuleniu ogólnym (Moens, 2010). W praktyce klinicznej spirometrię była rozpatrywana jako potencjalne narzędzie diagnostyczne do wczesnego rozpoznawania EA (Moens, 2010). Evans i in. powiązali wyniki spirometrii wysiłkowej z badaniem cytologicznym TW wykazując odwrotnie proporcjonalną korelację pomiędzy odsetkiem neutrofili i przepływem powietrza w drugiej połowie fazy wdechowej i wydechowej (Evans i in., 2011).

Spirometria koni stanowi wartościowe, nieinwazyjne narzędzie do oceny czynności układu oddechowego, szczególnie przydatne w diagnostyce i monitorowaniu EA. Choć jej zastosowanie kliniczne jest nadal ograniczone, rozwój technologii i prace nad standaryzacją metody pomiarowej mogą w przyszłości umożliwić jej szersze wykorzystanie w praktyce terenowej.

### **2.3.7.2. Elektryczna tomografia impedancyjna**

EIT jest nowoczesnym badaniem czynnościowym układu oddechowego, które umożliwia szybką i nieinwazyjną wizualizację regionalnej wentylacji płuc w czasie rzeczywistym. Jej zasada działania opiera się na pomiarze oporu elektrycznego tkanek (Ambrisko i in., 2015). Badanie wykonuje się poprzez założenie elastycznego pasa umiejscowionego wokół klatki piersiowej wyposażonego w elektrody. Jedna para elektrod wytwarza prąd o bardzo niskim i niewyczuwalnym natężeniu, natomiast pozostałe elektrody rejestrują różnice potencjałów pomiędzy miejscem elektrodami. Następnie na podstawie stosunku natężenia i napięcia obliczany jest opór tkanek (Brown, 2003). W ten sposób uzyskuje się obraz oporności płuc a tym samym informację o powietrzości poszczególnych obszarów płuc (Brown, 2003). Dodatkowo możliwe jest wyznaczenie procentowego udziału całkowitej wentylacji przypadający na poszczególne obszary płuc, co umożliwia ilościową ocenę dystrybucji powietrza w płucach. EIT znalazła szerokie zastosowanie w medycynie ludzkiej – zwłaszcza w intensywnej terapii (Brown, 2003). Uzyskane dzięki niej wskaźniki oporności pozwalają oceniać regionalną odpowiedź płuc na interwencje terapeutyczne, takie jak:

manewry rekrutacyjne (Bronco i in., 2021), regulacja poziomu dodatniego ciśnienia końcowo–wydechowego (ang. *positive end–expiratory pressure*, PEEP) (Bronco i in., 2021), dostosowanie VT (Soltész i in., 2025) i optymalizacja stężenia tlenu w mieszaninie oddechowej (ang. *fraction of inspired oxygen*, FiO<sub>2</sub>) (Lymperopoulos i in., 2017). EIT dostarcza również informacji na temat niepożądanych efektów wentylacji mechanicznej, które mogą być nasilane przez współistniejące choroby. Z tego względu EIT pozwala na indywidualizację ustawień respiratora oraz wykrywanie odmy opłucnowej (Bronco i in., 2021; Brown, 2003; Lymperopoulos i in., 2017). Ze względu na bezpieczeństwo i całkowitą nieinwazyjność, EIT może być z powodzeniem stosowana u pacjentów szczególnie wrażliwych, takich jak dzieci i noworodki.

U koni badania z wykorzystaniem EIT przeprowadzono u koni zdrowych oraz koni z lewostronną niewydolnością serca (Ambrisko i in., 2015; Sacks i in., 2021). Analiza rozkładu wentylacji wykazała przewagę VT w prawym płucu nad VT w płucu lewym oraz większy wskaźnik wentylacji w dobrzusznym obszarze płuc niż w obszarach dogrzbietowych (Ambrisko i in., 2015). EIT wykorzystywano również w znieczuleniu ogólnym do oceny dystrybucji wentylacji podczas manewru rekrutacyjnego (Moens i in., 2013). Schramel i in. opisali przesunięcie VT z dobrzusznego obszaru płuc do obszarów dogrzbietowych płuc u nowonarodzonych źrebiąt (Schramel i in., 2011). Mosing i in. opisali zjawisko autorekrutacji pęcherzyków poprzez zatrzymanie wdechu, a także przesunięcie wentylacji z dobrzusznego obszaru płuc do dogrzbietowych obszarów płuc w okresie wybudzania po znieczuleniu ogólnym (Mosing i in., 2016). EIT pozwoliła także ocenić różnice w wentylacji między oddechem spontanicznym, a kontrolowaną wentylacją mechaniczną, co tłumaczono zmianą pracy przepony (Auer i in., 2018; Mosing, Marly–Voquer, i in., 2016). EIT umożliwia również wykrywanie zmian w przepływie powietrza spowodowanego skurczem oskrzeli podczas testu prowokacyjnego z wykorzystaniem histaminy u zdrowych koni poddanych sedacji (Secombe i in., 2019). Wykazano również, że u koni z EA wzorzec oddychania ulega zmianie. W przebiegu EA dochodzi do zaniku dwufazowego wzorca przepływu powietrza, w szczególności w fazie wydechu. Wyniki te wstępnie potwierdzają, że EIT może być skuteczną metodą monitorowania czynności płuc w przebiegu EA (Herteman i in., 2021).

### **2.3.7.3. Oscylometria impulsowa**

IOS stanowi alternatywną metodę oceny czynności układu oddechowego, która polega na wprowadzaniu do dróg oddechowych krótkich impulsów ciśnieniowych wywołujących charakterystyczną odpowiedź przepływową. Analiza rejestrowanego sygnału umożliwia obliczenie rezystancji i reaktancji układu oddechowego. Techniki oscylometryczne od lat znajduje zastosowanie w badaniach oddechowych u dzieci, ponieważ wymagają jedynie spokojnego, pasywnego oddychania bez konieczności aktywnej współpracy pacjenta (Desiraju & Agrawal, 2016). Zaletą tą sprawiła, że IOS znalazła również zastosowanie w diagnostyce chorób układu oddechowego koni. Dzięki temu, że badanie nie wymaga głębokiej sedacji ani wysiłku ze strony zwierzęcia, IOS stanowi praktyczne narzędzie, które może być wykorzystywane zarówno w warunkach klinicznych jak i terenowych. Co istotne, aparaty IOS zostały zaadaptowane do warunków terenowych, co pozwala na ich zastosowanie bez potrzeby transportu zwierzęcia do ośrodka referencyjnego (Bizzotto i in., 2022).

IOS umożliwia ocenę funkcji układu oddechowego koni podczas spokojnego oddychania, co czyni go idealnym rozwiązaniem w przypadkach podejrzenia EA. Badania wykazały, że IOS pozwala na wczesne wykrycie zaburzeń oporu i reaktancji dróg oddechowych, a także umożliwia monitorowanie skuteczności leczenia w sposób powtarzalny i nieinwazyjny (Richard i in., 2009; Stucchi i in., 2018). W porównaniu do innych PFTs, takich jak spirometria, pletyzmografia przepływowa i próby prowokacyjne, IOS jest mniej inwazyjna i lepiej tolerowana przez konie (Erck i in., 2003; Van Erck i in., 2004).

### **2.4. Rozwój metod diagnostycznych chorób układu oddechowego koni**

W ostatnich latach zastosowanie sztucznej inteligencji (ang. *artificial intelligence*, AI) zyskuje coraz większe znaczenie we wspieraniu standardowej praktyki diagnostycznej. Systemy wspomagają lekarzy i radiologów w analizie obrazów medycznych, przyczyniając się do poprawy jakości opieki zdrowotnej (Mukhtorov i in., 2023). W medycynie ludzkiej, diagnostyka wspomagana komputerowo (ang. *computer-aided diagnosis*, CAD) jest wykorzystywana do automatycznej klasyfikacji m.in. obrazów endoskopowych (Ahmad i in., 2017; Yang i in., 2020), obrazów ultrasonograficznych (Ragab i in., 2022), radiogramów (Ashwini i in., 2023), tomogramów (Ozsahin i in., 2020) oraz obrazów uzyskiwanych metodą MR (Cheng

i in., 2017) i metodą pozytonowej tomografii emisyjnej (ang. *positron emission tomography*, PET) (Kebir i in., 2019). CAD znajduje zastosowanie m.in. w badaniach przesiewowych oraz wykrywaniu i monitorowaniu wczesnych objawów chorób. CAD oferuje szereg korzyści diagnostycznych takich jak: zmniejszenie ryzyka błędnego rozpoznania, zwiększenie trafności rozpoznań oraz skrócenie czasu potrzebnego na postawienie diagnozy, co w konsekwencji pozwala na wcześniejsze wdrożenie odpowiedniego leczenia (Ahmad i in., 2017; Mukhtorov i in., 2023). W medycynie ludzkiej, szczególnie dynamiczny rozwój metod CAD obserwuje się w badaniu endoskopowym przewodu pokarmowego, w których systemy te wspomagają wczesne wykrywanie zmian takich jak polipy, owrzodzenia czy perforacje. Z tego względu wykorzystanie CAD przyczynia się to do zmniejszenia zachorowalności i śmiertelności z powodu nowotworów układu pokarmowego (Banik i in., 2020; Gaur i in., 2021; Yue i in., 2023).

W medycynie weterynaryjnej, zwłaszcza w kontekście praktyki klinicznej koni, zastosowanie CAD pozostaje wciąż ograniczone. Dotychczas opublikowane badania koncentrują się głównie na klasyfikacji radiogramów (Guo i in., 2024; Turek i in., 2025) i tomogramów (Borowska, 2023), jak również na automatyzacji rutynowych zadań, takich jak segmentacja tomogramów czy wykonywanie pomiarów morfometrycznych (Bakıcı i in., 2022; Borowska i in., 2024). Opisane w niniejszej pracy zastosowanie CAD do analizy obrazów endoskopowych układu oddechowego koni (Kozłowska i in., 2025) jest pierwszą tego typu publikacją, co sprawia, że obszar ten pozostaje w dużej mierze niezbadany. W pracy tej wykorzystano obrazy endoskopowe gardła pozwalające na rozpoznanie PLH na podstawie wzrostu liczby oraz wielkości grudek limfatycznych, które jest wprost proporcjonalne do nasilenia choroby. Grudki te można traktować jako obiekty, których automatyczne wykrywanie – przy użyciu techniki opartej na wykrywaniu obiektów – może stanowić punkt wyjścia do cyfrowej analizy obrazu endoskopowego. W tym celu zaproponowano wykorzystanie diagramów Woronoja – do ilościowej oceny rozkładu przestrzennego grudek limfatycznych oraz statystyk pierwszego rzędu (ang. *first-order statistics*, FOS) – do analizy cech tekstury obrazów. Obydwie metody były z powodzeniem wykorzystywane w badaniach nad cyfrową analizą obrazów termograficznych (Domino i in., 2022), radiograficznych (Górski i in., 2022) oraz mikroskopowych (Toutain i in., 2012) koni, co wskazuje na ich potencjalną przydatność w nowej analizie innych typów obrazów – takich jak obrazy endoskopowe.

### 3. Cel pracy i hipotezy badawcze

Przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej jest rozwiązanie problemu naukowego dotyczącego zależności pomiędzy współwystępowaniem wybranych chorób górnych i dolnych dróg oddechowych koni, ze szczególnym uwzględnieniem roli nowoczesnych metod diagnostycznych, w tym wspomaganego komputerowo przetwarzania obrazów. Dotychczasowe badania nad chorobami układu oddechowego koni często rozdzielały diagnostykę górnych i dolnych jego odcinków. Tymczasem w praktyce klinicznej obserwuje się częste współwystępowanie omawianych chorób, co może wpływać zarówno na obserwowany obraz kliniczny jak i skuteczność ich leczenia. Z tego względu ogólnym celem niniejszej dysertacji jest implementacja koncepcji „*one airway – one disease*” w medycynie weterynaryjnej koni, a tym samym pogłębienie wiedzy na temat możliwości diagnostycznych i związku między chorobami górnych i dolnych dróg oddechowych – w szczególności niedostatecznie poznanego związku między PDs, PLH, i EA.

Cele pracy:

[P.1] Celem pracy przeglądowej było przedstawienie podstawowych i zaawansowanych metod obrazowania i badania czynnościowego układu oddechowego oraz zestawienie ich zalet, ograniczeń i zastosowania w diagnostyce wybranych chorób układu oddechowego koni (Kozłowska i in., 2022).

[P.2] Celem pracy badawczej była ocena zależności między występowaniem wybranych chorób podniebienia miękkiego (PI, DDSP) i SEA; ocena związku między występowaniem PDs i nasileniem objawów klinicznych EA; oraz ocena wpływu farmakologicznego leczenia EA na występowanie PDs (Kozłowska i in., 2023).

[P.3] Celem pracy badawczej była ocena zależności między występowaniem PLH i EA oraz ocena związku między nasileniem PLH i nasileniem objawów klinicznych EA (Kozłowska i in., 2024).

[P.4] Celem pracy badawczej była kwantyfikacja objawów endoskopowych PLH oraz zastosowanie CAD do oceny nasilenia PLH, które wprowadza CAD do diagnostyki chorób górnych dróg oddechowych koni (Kozłowska i in., 2025).

W oparciu o cele rozprawy sformułowano następujące hipotezy badawcze:

Hipoteza 1 [P.2]

PI i DDSP występują częściej u koni z SEA niż u koni bez SEA (Kozłowska i in., 2023).

Hipoteza 2 [P.2]

U koni z PI i DDSP przebieg SEA jest cięższy niż u koni bez PI i DDSP (Kozłowska i in., 2023).

Hipoteza 3 [P.2]

Skuteczne leczenie SEA prowadzi do poprawy stanu klinicznego konia zarówno w zakresie objawów SEA jak i objawów PI i DDSP (Kozłowska i in., 2023).

Hipoteza 4 [P.3]

PLH występuje częściej u koni z EA niż u koni bez EA (Kozłowska i wsp., 2024).

Hipoteza 5 [P.3]

U koni z PLH przebieg EA jest cięższy niż u koni bez PLH (Kozłowska i wsp., 2024).

Hipoteza 6 [P.3]

U koni z SEA nasilenie PLH jest większe niż u koni z MEA (Kozłowska i wsp., 2024).

Hipoteza 7 [P.4]

Objawy endoskopowe PLH mogą być kwantyfikowane i poddawane analizie komputerowej (Kozłowska i wsp., 2025).

Hipoteza 8 [P.4]

Techniki przetwarzania obrazów endoskopowych oparta na wykrywaniu obiektów umożliwi CAD nasilenia PLH (Kozłowska i wsp., 2025).



## **4. Zakres pracy**

### **4.1. Materiały**

#### **4.1.1. Projekt badań omówionych w publikacji [P.2]**

Obserwacyjne badanie prospektywne przeprowadzono na grupie czterdziestu sześciu koni ( $n = 46$ ) z rozpoznaną SEA. Zostało ono zrealizowane w latach 2020–2022 w Klinice Koni Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Wszystkie konie włączone do badania były własnością prywatną i były użytkowane rekreacyjnie. Właściciele wyrazili pisemną zgodę na udział zwierząt w badaniu. Ponieważ zastosowane procedury stanowiły standardowe badania diagnostyczne, nie wymagały one uzyskania zgody komisji etycznej. Do udziału w badaniu zakwalifikowano konie z udokumentowaną historią SEA (nawracającymi epizodami duszności), które w momencie rozpoczęcia badania prezentowały objawy kliniczne SEA. Wykluczono zwierzęta, które w ciągu czterech tygodni poprzedzających badanie otrzymywały leki sterydowe, leki rozszerzające oskrzela, antybiotyki lub immunoterapię swoistą. Materiały wykorzystane w niniejszym badaniu opisano szczegółowo w publikacji Kozłowska i in. (2023).

#### **4.1.2. Projekt badań omówionych w publikacji [P.3]**

Obserwacyjne badanie prospektywne przeprowadzono na grupie dziewięćdziesięciu trzech koni ( $n = 93$ ) z podejrzeniem EA. Badanie realizowano w latach 2020 – 2024 w Klinice Koni Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Wszystkie konie włączone do badania były własnością prywatną i były użytkowane rekreacyjnie. Właściciele wyrazili pisemną zgodę na udział zwierząt w badaniu. Ponieważ zastosowane procedury stanowiły standardowe badania diagnostyczne, nie wymagały one uzyskania zgody komisji etycznej. Do udziału w badaniu zakwalifikowano konie z objawami klinicznymi sugerującymi EA. Wykluczono zwierzęta, które w ciągu czterech tygodni poprzedzających badanie otrzymywały leki sterydowe, leki rozszerzające oskrzela, antybiotyki lub immunoterapię swoistą. Z badania wykluczono 12 koni (7 z powodu przyjmowania leków sterydowych, 3 z powodu przyjmowania antybiotyków oraz 2 z powodu przyjmowania leków rozszerzających oskrzela), co dało ostateczną grupę badawczą liczącą osiemdziesiąt jeden koni ( $n = 81$ ). Materiały wykorzystane w niniejszym badaniu opisano szczegółowo w publikacji Kozłowska i in. (2024).

#### **4.1.3. Projekt badań omówionych w publikacji [P.4]**

Analityczne badanie retrospektywne przeprowadzono na dokumentacji klinicznej dwustu dziewiętnastu koni gorącokrwistych ( $n = 219$ ), u których przeprowadzono badanie endoskopowe w latach 2022 – 2025 w Klinice Koni Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Wszystkie zwierzęta były własnością prywatną. Badanie endoskopowe wykonano ze względu na występowanie objawów chorób układu oddechowego lub w ramach badania kupno–sprzedaż. Do badania włączono konie w wieku powyżej 5. roku życia, posiadające kompletną dokumentację kliniczną obejmującą: badanie ogólne, badanie szczegółowe układu oddechowego oraz spoczynkowe badanie endoskopowe górnych dróg oddechowych. Do badania zakwalifikowano siedemdziesiąt koni ( $n = 70$ ) spełniających powyższe kryteria, natomiast sto czterdzieści dziewięć koni ( $n = 149$ ) wykluczono, głównie z powodu zbyt młodego wieku. Materiały wykorzystane w niniejszym badaniu opisano szczegółowo w publikacji Kozłowska i in. (2025).

#### **4.2. Metody**

U wszystkich koni włączonych do badania omówionego w publikacji [P.2] przeprowadzono: wywiad, badanie ogólne, badanie szczegółowe układu oddechowego, spoczynkowe badanie endoskopowe górnych i dolnych dróg oddechowych, badanie cytologiczne TW i BALf oraz badanie bakteriologiczne TW. Następnie przeprowadzono dynamiczne badanie endoskopowe w celu oceny obecności objawów PDs. Konie poddano 21–dniowemu farmakologicznemu leczeniu EA. Po zakończeniu leczenia przeprowadzono badanie kontrolne obejmujące: badanie ogólne, badanie szczegółowe układu oddechowego, spoczynkowe badanie endoskopowe oraz dynamiczne badanie endoskopowe. Metody wykorzystane w niniejszym badaniu opisano szczegółowo w publikacji Kozłowska i in. (2023).

U wszystkich koni włączonych do badania omówionego w publikacji [P.3] przeprowadzono: wywiad, badanie ogólne, badanie szczegółowe układu oddechowego, spoczynkowe badanie endoskopowe górnych i dolnych dróg oddechowych oraz badanie cytologiczne TW i BALf. Metody wykorzystane w niniejszym badaniu opisano szczegółowo w publikacji Kozłowska i in. (2024).

Dla wszystkich koni włączonych do badania omówionego w publikacji [P.4] analizowano wyniki: badanie ogólnego, badanie szczegółowego układu oddechowego

oraz spoczynkowego badania endoskopowego górnych dróg oddechowych. Z każdego badania endoskopowego eksportowano reprezentatywne obrazy gardła, które poddano analizie cyfrowej z wykorzystaniem techniki przetwarzania obrazów cyfrowych opartej na wykrywaniu obiektów. Uzyskane dane kliniczne i dane cyfrowe wykorzystano do CAD PLH z zastosowaniem algorytmów AI. Skuteczność CAD poddano ocenie z wykorzystaniem metryk klasyfikacji. Metody wykorzystane w niniejszym badaniu opisano szczegółowo w publikacji Kozłowska i in. (2025).

Metody wykorzystane w kolejnych badaniach zestawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Metody wykorzystane w badaniach omówionych w cyklu publikacji Kozłowska i in. (2023) [P.2], Kozłowska i in. (2024) [P.3] i Kozłowska i in. (2025) [P.4].

| Metody / Publikacje                    | [P.2] | [P.3] | [P.4] |
|----------------------------------------|-------|-------|-------|
| Wywiad                                 | x     | x     | —     |
| Badanie ogólne                         | x     | x     | x     |
| Badanie szczegółowe układu oddechowego | x     | x     | x     |
| Dynamiczne badanie endoskopowe         | x     | —     | —     |
| Spoczynkowe badanie endoskopowe        | x     | x     | x     |
| Analiza WT/BALf                        | x     | x     | —     |
| Analiza wizualna obrazów endoskopowych | x     | x     | x     |
| Analiza cyfrowa obrazów endoskopowych  | —     | —     | x     |
| Analiza statystyczna                   | x     | x     | x     |
| Leczenie                               | x     | —     | —     |

#### 4.2.1. Wywiad

Dane z wywiadu zebrano zgodnie z rekomendowanymi wytycznymi w formie ankiety wypełnianej przez właścicieli (Couët il i in., 2016). Uwzględniono szczegółowe informacje dotyczące historii medycznej w tym: historię występowania objawów chorób układu oddechowego i nietolerancji wysiłkowej, użytkowania oraz warunków

utrzymania konia w tym: schematu żywienia, typu stajni/typu utrzymania, rodzaju ściółki, dostępu do pastwiska, lokalizacji magazynu siana i słomy, wentylacji stajni oraz sprzątania stajni. W wywiadzie uwzględniono także datę ostatniego podania leków sterydowych, leków rozszerzających oskrzela, antybiotyków i swoistej immunoterapii.

#### **4.2.2. Badania kliniczne układu oddechowego**

Badanie ogólne obejmowało pomiar temperatury wewnętrznej ciała, częstości skurczów serca i liczby oddechów, ocenę barwy i wilgotności błon śluzowych, czasu wypełnienia kapilar oraz palpacyjną ocenę węzłów chłonnych. Badanie szczegółowe układu oddechowego obejmowało osłuchiwanie tchawicy i płuc, ocenę pracy nozdrzy i tłoczni brzusznej, a także obecności i nasilenia wydzieliny z nozdrzy oraz kaszlu. Uzyskane objawy kliniczne oceniano ilościowo przy użyciu zmodyfikowanego systemu punktowego (Lavoie i in., 2019) obejmującego siedem następujących parametrów: liczba oddechów (0–3 pkt), wydzielina z nozdrzy (0–2 pkt), osłuchiwanie tchawicy (0–3 pkt), osłuchiwanie płuc (0–3 pkt), praca nozdrzy (0–1 pkt), kaszel (0–2 pkt) oraz praca tłoczni brzusznej (0–2 pkt). Sumaryczny wynik odzwierciedlał nasilenia objawów klinicznych u każdego konia. Zastosowany system oceny punktowej nasilenia objawów klinicznych omówiono i zestawiono w Tabeli 4 we wstępie pracy.

#### **4.2.3. Dynamiczne badanie endoskopowe układu oddechowego**

Dynamiczne badanie endoskopowe przeprowadzono z wykorzystaniem przenośnego endoskopu kantarowego (ETL 2, Dr Fritz Endoscopes GmbH, Tuttlingen, Niemcy). Badanie przeprowadzono bez sedacji. Badanie przeprowadzano podczas regularnej pracy pod siodłem, przy intensywności dostosowanej zarówno do poziomu wytrenowania konia, jak i nasilenia objawów klinicznych SEA oraz PD. Rejestrację obrazu rozpoczynano przed rozpoczęciem wysiłku, a kończono w fazie odpoczynku. Ocenie poddano funkcję krtani i gardła oraz ruchomość i pozycję tylnej części podniebienia miękkiego.

#### **4.2.4. Spoczynkowe badanie endoskopowe układu oddechowego**

Spoczynkowe badanie endoskopowe została przeprowadzona przy użyciu giętkiego wideoendoskopu (Karl Storz, Niemcy). Konie poddano sedacji przy użyciu detomidyny (Domosedan; Orion Corporation, Finlandia; 0,01 mg/kg m.c., i.v.) oraz butorfanolu (Torbugesic; Zoetis Polska Sp. z o.o.; 0,01 mg/kg m.c., i.v.). Dawki leków dostosowywano do masy ciała konia.

Aby ograniczyć odruch kaszlu podczas pobierania BALf i TW zastosowano znieczulenie miejscowe (rozwór 5 ml lidokainy (Lidor 20 mg/mL, Richter Pharma, Wels, Austria) w 20 ml soli fizjologicznej (Baxter, Warszawa, Polska)) w okolicy rozwidlenia tchawicy. Podczas badania oceniano okolicę nosogardzieli, krtań, tchawicę wraz z rozwidleniem oraz duże oskrzela. Ocenie poddano wygląd błon śluzowych, obecność i charakter wydzieliny oraz występowanie nieprawidłowości.

#### **4.2.5. Analiza popłuczyn z tchawicy i drzewa oskrzelowego**

Próbki TW i BALf pobierano zgodnie z wykorzystaniem cewnika KRUUSE (Langeskov, Dania) zgodnie z procedurami opisanymi przez Couetila i in. i Hoffmana (Couetil i in., 2001a; Hoffman, 2008).

W przypadku TW, cewnik wprowadzono przez kanał roboczy endoskopu do tchawicy, a następnie podano 30 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej (Baxter, Warszawa, Polska). Materiał pobierano z okolicy wpustu tchawicy do klatki piersiowej. Próbki umieszczano w jałowych pojemnikach do badania bakteriologicznego (Deltalab, Barcelona, Hiszpania) oraz w probówkach z EDTA do badania cytologicznego (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

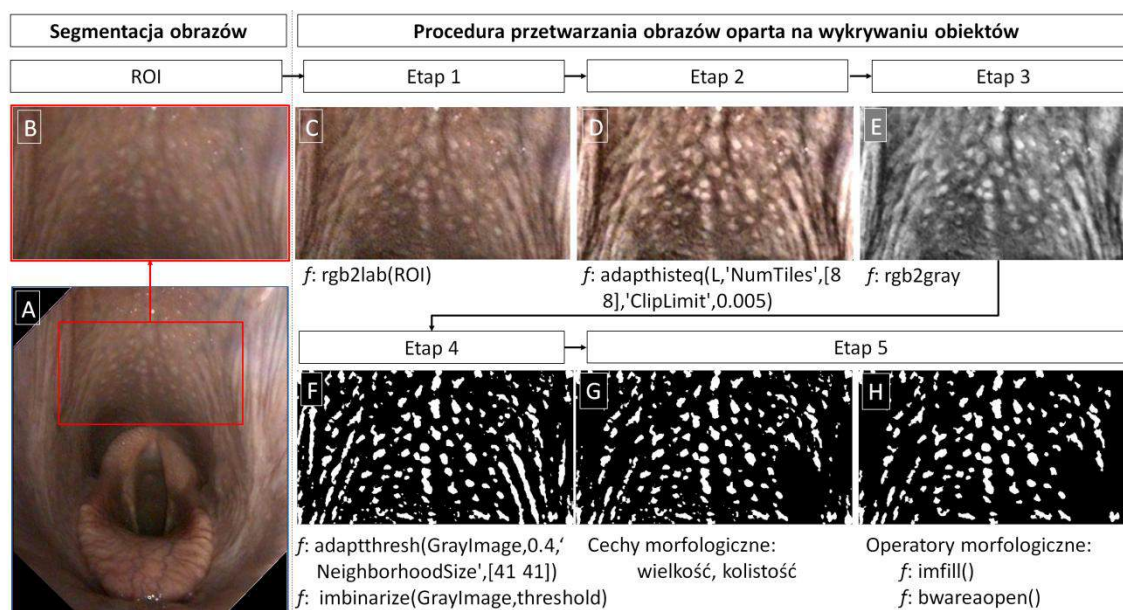
W przypadku BALf, cewnik wprowadzono przez drugi otwór nosowy do tchawicy pod kontrolą endoskopu. Po napotkaniu oporu podczas wprowadzania – wskazującego na osiągnięcie poziomu dużych oskrzeli – cewnik fiksowano za pomocą balonika umieszczonego na jego końcu. Następnie podawano 250 ml sterylnego roztworu soli fizjologicznej (Baxter, Warszawa, Polska), który następnie aspirowano. Próbki umieszczano w probówkach z EDTA do badania cytologicznego (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Pobrane próbki TW i BALf wirowano ( $300 \times g$ , 10 min), supernatant usuwano, a pozostały osad nanoszono na szkiełka mikroskopowe w celu przygotowania rozmazów. Rozmazy suszono, utrwalało (Cytofix, Samko, Warszawa, Polska) i przesyłano do komercyjnego laboratorium weterynaryjnego (Laboklin Laboratory, Warszawa, Polska), w którym była wykonywane badania cytologiczne i bakteriologiczne. Wyniki badań cytologicznych przedstawiano jako odsetek neutrofilów, makrofagów i limfocytów, natomiast wyniki badań bakteriologicznych określano według typu i nasilenia wzrostu bakterii (brak –, łagodny +, umiarkowany ++, silny +++). Bakterie patogenne rozróżniano od potencjalnych zanieczyszczeń zgodnie

z wytycznymi Richarda i in. (Richard i in., 2010). Próbkki zawierające więcej niż trzy typy bakterii uznawano za zanieczyszczone.

#### 4.2.6. Analiza obrazów endoskopowych

Reprezentatywne obrazy endoskopowe gardła zapisywano w formacie BMP, a następnie pozycjonowano i skalowano względem lokalizacji krtani. Na każdym obrazie anotowano obszar zainteresowania (ang. *region of interest*, ROI) o wymiarach  $297 \times 533$  pikseli, który następnie wycinano, zapisywano w formacie BMP i importowano do programu MATLAB (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). Każdy ROI przetwarzano z wykorzystaniem pięcioetapowej techniki opartej na wykrywaniu obiektów (rycina 5).



Rycina 5. Schemat przetwarzania cyfrowych obrazów endoskopowych: obraz surowy po pozycjonowaniu i skalowaniu (A), region zainteresowania (ang. *region of interest*, ROI) wyodrębniony z obrazu surowego (B), obraz po wstępnym przetwarzaniu (etap 1) (C), obraz po wzmocnieniu kontrastu (etap 2) (D), obraz po przekształceniu do skali szarości (etap 3) (E), obraz po wstępnym wykrywaniu obiektów (etap 4) (F), obraz po udoskonalonym wykrywaniu obiektów (etap 5) złożonym z dwóch etapów: usunięcia zbyt długich obiektów na podstawie cech morfologicznych (G) oraz usunięcia zbyt małych obiektów na podstawie operatorów morfologicznych (H).

Etap 1 obejmował wstępne przetwarzanie obrazu poprzez przekształcenie z przestrzeni RGB do przestrzeni CIE Lab. Konwersja ta umożliwiła niezależne operowanie składową jasności bez wpływu na komponenty chromatyczne (Hunter, 1958). Etap 2 obejmował wzmocnienie kontrastu obrazu i został przeprowadzony w celu poprawy widoczności szczegółów obrazu z zastosowaniem algorytmu adaptacyjnego wyrównywania histogramów (Zuiderveld, 1994). Etap 3 obejmował przekształcenie obrazów do skali, co pozwoliło na uproszczenie danych wejściowych do kolejnych etapów przetwarzania. Etap 4 polegał na wstępnym wykrywaniu obiektów z wykorzystaniem adaptacyjnego progu, a następnie przekształcenie obrazu do formatu binarnego (0–1) umożliwiającą dalszą segmentację obiektów. Etap 5 polegał na udoskonalonym wykuwaniu obiektów. Na tym etapie zbyt długie obiekty usuwano na podstawie cech morfologicznych (takich jak wielkość i kolistość), a zbyt małe obiekty usuwano z wykorzystaniem standardowych operatorów morfologicznych dostępnych w programie.

Zastosowanie opisanej techniki cyfrowego przetwarzania obrazu pozwoliło na zidentyfikowanie i zliczenie obiektów odpowiadających grudkom limfatycznym w błonie śluzowej gardła. Następnie dla każdego obiektu wyznaczono diagram Woronoja, reprezentujący zbiór punktów na płaszczyźnie. Płaszczyznę podzielono na tzw. regiony Woronoja, które zawierały punkty na płaszczyźnie znajdujące się bliżej przypisanego obiektu/grudki limfatycznej niż innego obiektu (Dobrin, 2005). Diagramy te wykorzystano do przeprowadzenia analizy obszarów geometrycznych uzyskując następujące cechy obrazu: Area, Area Over Voronoi, Number of Neighbors, Mean Neighbor Distance, Regularity oraz Voronoi Entropy (Huang i in., 2018; Lau i in., 2021; Sudbø i in., 2000).

Dla każdego wykrytego obiektu/grudki limfatycznej wyodrębniono także cechy tekstury obrazu z wykorzystaniem FOS uzyskując następujące cechy obrazu: Mean, Standard Deviation, Median, Range, Variance, Skewness, Kurtosis, Root Mean Squared, Minimum, Maximum, 10th Percentile, 90th Percentile, Dominant 01, Dominant 10, Maximum of Moment 01 i Maximum of Moment 10.

Dla każdego obiektu/grudki chłonnej uzyskano 6 cech diagramu Woronoja oraz 16 cech FOS reprezentujących dane cyfrowe. Ze względu na różną liczbę wykrytych obiektów w zależności od stopnia zaawansowania PLH, dla każdego obrazu obliczono średnie wartości cech, które następnie wykorzystano w dalszej analizie danych.

#### 4.2.7. Analiza statystyczna

Współwystępowanie chorób górnych i dolnych dróg oddechowych – odpowiednio PI i SEA, DDSP i SEA, PLH i MEA oraz PLH i SEA – porównywano przy użyciu testu chi–kwadrat.

Dane ilościowe – reprezentujące kwantyfikowalne dane kliniczne oraz dane cyfrowe – badane pod względem zgodności rozkładu z rozkładem normalnym przy użyciu testu Shapiro–Wilka (w [P.2] i [P.3]) lub testu Kołmogorowa–Smirnowa (w [P.4]). Ponieważ nie wszystkie serie danych rozkładały się zgodnie z rozkładem normalnym pary danych porównywano z wykorzystaniem parowanego testu Wilcoxona lub testu Manna–Whitneya, a zbiory danych reprezentowane przez więcej niż dwie serie danych porównywano z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji wpartej testem wielokrotnych porównań Holma–Sidaka lub testu Kruskala–Wallisa wspartego testem wielokrotnych porównań Dunna. Dla wybranych par danych obliczano współczynnik korelacji rang Spearmana. Różnice pomiędzy seriami danych i badane korelacje uznano za istotne dla  $p < 0,05$ . Analizy statystyczne wykonano w programie GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Następnie w badaniach opisanych w publikacji [P.4] dane grupowano w trzy zestawy: dane kliniczne, dane cyfrowe oraz połączone dane kliniczne i cyfrowe. Dla każdego zestawu danych zastosowano ten sam schemat klasyfikacji. W pierwszym kroku zastosowano liniową analizę dyskryminacyjną (ang. *linear discriminant analysis*, LDA) w celu redukcji wymiarowości zbiorów danych (Lin i in., 2021), co pozwala na uproszczenie klasyfikacji (Adebiyi i in., 2022; Rezaei, 2021). LDA zaimplementowano przy użyciu biblioteki scikit–learn w języku Python (Pedregosa i in., 2011). W drugim kroku wyznaczono dane kliniczne i dane cyfrowe o najwyższej istotności (Babenko i in., 2023; Jasti i in., 2022), które wykorzystano w klasyfikacji PLH z wykorzystaniem algorytmu lasu losowego (ang. *random forest*, RF). Algorytm RF zaimplementowano w bibliotece scikit–learn w Pythonie (Breiman, 2001; Pedregosa i in., 2011). Skuteczność klasyfikacji – a co za tym idzie skuteczność CAD – oceniano przy pięciokrotnej stratyfikowanej walidacji krzyżowej z wykorzystaniem czterech metryk klasyfikacji: dokładności (accuracy), precyzji (precision), czułości (recall) oraz miara F1.



#### **4.2.8. Leczenie**

W badaniu omówionym w publikacji [P.2] konie poddano 21–dniowemu leczeniu farmakologicznemu SEA zgodnie z jednym z dwóch protokołów. Oba protokoły obejmowały podawanie leków sterydowych i leków rozszerzających oskrzela. W protokole 1 leki podawano ogólnie, natomiast w protokole 2 leki podawano miejscowo za pomocą nebulizacji (Flexineb®, Nortev Ltd., Galway, Irlandia). Wybór protokołu dla każdego konia zależał od nasilenia objawów klinicznych, preferencji właściciela oraz dostępności nebulizatora. Trzydzieści sześć koni leczono zgodnie z protokołem 1, a 10 koni zgodnie z protokołem 2. W przypadku dodatniego wyniku hodowli bakteryjnej z próbki TW wdrażano terapię antybiotykową dostosowaną do wyników antybiogramu. Szczegóły leczenia koni z SEA, obejmujące również rekomendacje dotyczące zmiany warunków środowiskowych, opisano w Kozłowska i in., 2023.

## 5. Wyniki i dyskusja

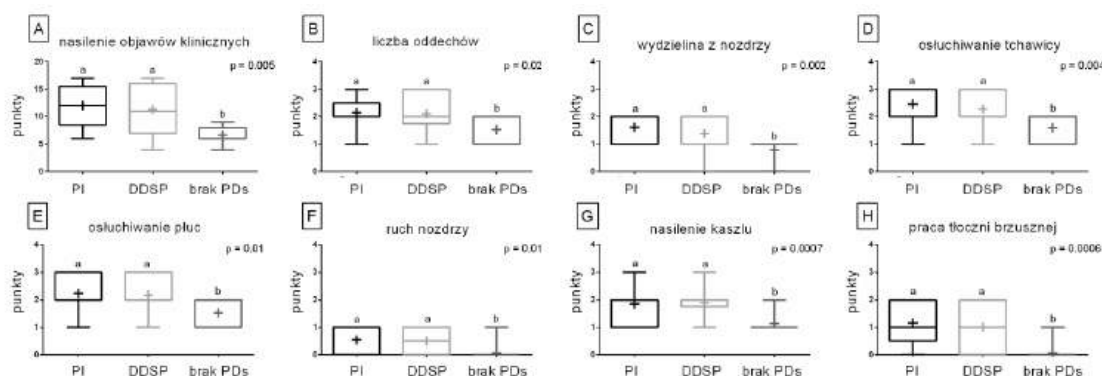
### 5.1. Wyniki badań nad zależnością między chorobami podniebienia i astmą koni

U koni z SEA przed rozpoczęciem leczenia, PI stwierdzono u 31 osobników (67,4%), natomiast DDSP u 18 osobników (39,1%). U 18 koni (39,1%) stwierdzono współwystępowanie PI i DDSP, u 13 koni (28,3%) obserwowano wyłącznie PI, a u 15 koni (32,6%) nie stwierdzono objawów klinicznych PDs. Po zakończeniu leczenia SEA, u 42 koni (91,3%) nie odnotowano objawów PDs, natomiast u czterech koni (8,7%), nadal obserwowano objawy DDSP. Analiza występowania PDs wykazała, że przed leczeniem SEA PI występowało częściej niż DDSP. Niezależnie od rodzaju PDs, częstość występowania PI i DDSP była istotnie niższa po leczeniu SEA w porównaniu z okresem przed leczeniem SEA (tabela 6).

Tabela 6. Występowanie niestabilności podniebienia miękkiego (ang. *palatal instability*, PI) i dogrzbietowego przemieszczenia podniebienia miękkiego (ang. *dorsal displacement of soft palate*, DDSP) u koni z ciężką astmą koni (ang. *severe equine asthma*, SEA), przed i po leczeniu objawów SEA.

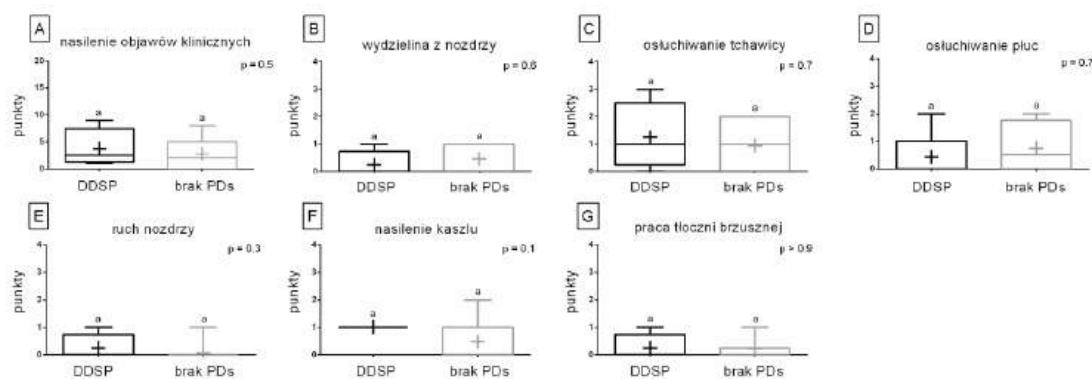
| Przed leczeniem SEA |             |            |             |
|---------------------|-------------|------------|-------------|
|                     | Obecne DDSP | Brak DDSP  | Suma        |
| Obecne PI           | 18 (39,1%)  | 13 (28,3%) | 31 (67,4%)  |
| Brak PI             | 0           | 15 (32,6%) | 15 (32,6%)  |
| Suma                | 18 (39,1%)  | 28 (60,9%) | 46 (100,0%) |
| Po leczeniu SEA     |             |            |             |
|                     | Obecne DDSP | Brak DDSP  | Suma        |
| Obecne PI           | 0           | 0          | 0           |
| Brak PI             | 4 (8,7%)    | 42 (91,3%) | 46 (100,0%) |
| Suma                | 4 (8,7%)    | 42 (91,3%) | 46 (100,0%) |

Analiza ilościowa objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni przed leczeniem SEA wykazała, większe nasilenie objawów klinicznych w grupach koni z objawami PI i DDSP w porównaniu z grupą koni bez objawów PDs. Różnice dotyczyły sumy punktów przyznawanych za nasilenie poszczególnych objawów klinicznych, porównywanych zarówno łącznie jak i oddzielnie. Nie stwierdzono istotnych różnic między grupami z PI i DDSP (rycina 6).



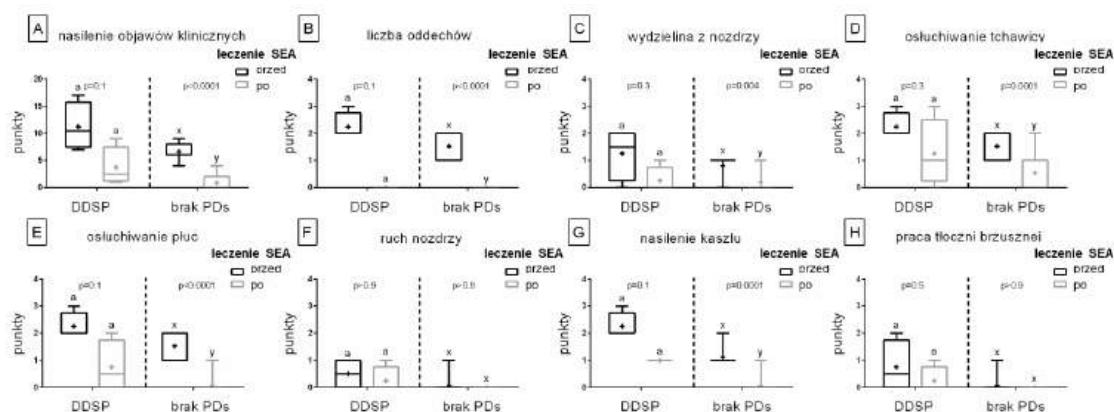
Rycina 6. Ocena ilościowa objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni z ciężką astmą koni (ang. *severe equine asthma*, SEA) przed leczeniem SEA. Ocenę ilościową przedstawiono łącznie dla sumy objawów klinicznych (A) oraz oddzielnie dla poszczególnych objawów: liczby oddechów (B), wydzieliny z nozdrzy (C), osłuchiwania tchawicy (D), osłuchiwania płuc (E), ruchu nozdrzy (F), obecności kaszlu (G) i pracy tłoczni brzusznej (H). Małe litery oznaczają istotne różnice między grupami reprezentującymi niestabilność podniebienia miękkiego (ang. *palatal instability*, PI), dogrzbietowe przemieszczenie podniebienia miękkiego (ang. *dorsal displacement of soft palate*, DDSP) i brak chorób podniebienia (ang. *palatal diseases* PDs) dla  $p < 0,05$ .

Porównując ilościowo objawy kliniczne chorób układu oddechowego koni po leczeniu SEA, należy zauważyć, że żaden z badanych koni nie wykazywał objawów PI, a konie z DDSP nie wykazywały zwiększonej liczby oddechów. W związku z tym objawów tych nie uwzględniono na rycinie 7. Nie stwierdzono istotnych różnic w nasileniu badanych objawów klinicznych u koni z DDSP oraz u koni bez PDs – porównywanych zarówno łącznie jak i oddzielnie (rycina 7).



Rycina 7. Ocena ilościowa objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni z ciężką astmą koni (ang. *severe equine asthma*, SEA) po leczeniu SEA. Ocenę ilościową przedstawiono łącznie dla sumy objawów klinicznych (A) oraz oddzielnie dla poszczególnych objawów: wydzieliny z nozdrzy (B), osłuchiwania tchawicy (C), osłuchiwania płuc (D), ruchu nozdrzy (E), obecności kaszlu (F) i pracy tłoczni brzusznej (G). Małe litery oznaczają istotne różnice między grupami reprezentującymi dogrzbiotowe przemieszczenie podniebienia miękkiego (ang. *dorsal displacement of soft palate*, DDSP) i brak chorób podniebienia (ang. *palatal diseases*, PDs) dla  $p < 0,05$ .

Porównanie nasilenia objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni przed i po leczeniu SEA wykazało, że u 4 koni po leczeniu SEA nadal występowały objawy DDSP. W tej grupie nie stwierdzono istotnych zmian w nasileniu objawów klinicznych w zależności od leczenia SEA. Natomiast u 15 koni, u których nie występowały objawy PDs przed leczeniem SEA, stwierdzono mniejsze nasilenie objawów klinicznych po leczeniu niż przed leczeniem – zarówno w odniesieniu do sumy badanych objawów klinicznych jak i liczby oddechów, ilości wydzieliny z nozdrzy, osłuchiwania tchawicy i płuc oraz nasilenia kaszlu (rycina 8).



Rycina 8. Ocena ilościowa objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni z ciężką astmą (EA) przed i po leczeniu. Ocenę ilościową przedstawiono łącznie dla sumy objawów klinicznych (A) oraz oddzielnie dla poszczególnych objawów: liczby oddechów (B), wydzieliny z noszrzy (C), osłuchiwania tchawicy (D), osłuchiwania płuc (E), ruchu noszrzy (F), obecności kaszlu (G) i pracy tŁoczni brzusznej (H). Małe litery oznaczają istotne różnice między stanem przed i po leczeniu dla grupy reprezentującej dogrzbietowe przemieszczenie podniebienia miękkiego (ang. *dorsal displacement of soft palate*, DDSP) i brak chorób podniebienia (ang. *palatal diseases* PDs) dla  $p < 0,05$ .

Pozostałe wyniki uzyskane w niniejszym badaniu opisano szczegółowo w Kozłowska i in., 2023

## 5.2. Wyniki badań nad zależnością między grudkowym zapaleniem gardła i astmą koni

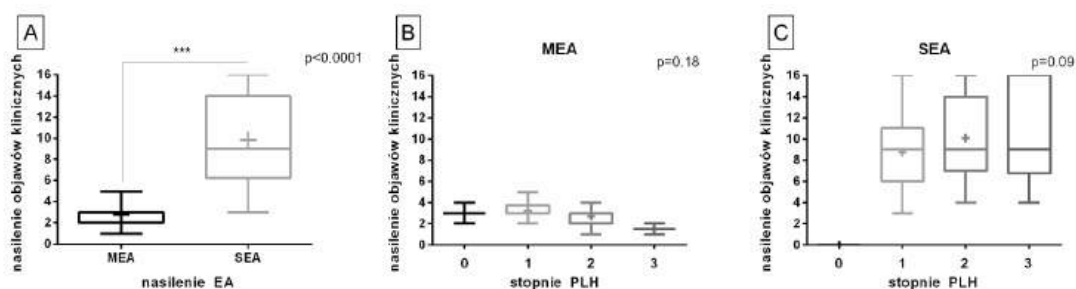
U koni wolnych od EA, stwierdzono PLH u 4 osobników (40,0%), w pozostałych przypadkach nie odnotowano PLH. W grupie koni z MEA, PLH nie stwierdzono u 2 koni (8,7%) a u pozostałych koni stwierdzono PLH – w tym u 8 koni (34,8%) stwierdzono PLH stopnia 1, u 11 koni (47,8%) PLH stopnia 2 i u 2 koni (8,7%) PLH stopnia 3. Z kolei w grupie koni z SEA, PLH stwierdzono o wszystkich badanych koni – w tym PLH stopnia 1 u 11 koni (23,4%), PLH stopnia 2 u 19 koni (40,4%) i PLH stopnia 3 u 17 koni (36,2%). W badaniu tym nie stwierdzono koni z objawami endoskopowymi PLH stopnia 4 w żadnej z badanych grup (bez EA, MEA i SEA).

Analiza występowania PLH i EA wykazała, że częstość występowania PLH była istotnie wyższa u koni z EA niż u koni wolnych od choroby, a także wyższa w grupie SEA w porównaniu z MEA ( $p = 0,025$ ) (tabela 7).

Tabela 7. Współwystępowanie grudkowego zapalenia gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH) u koni z astmą koni (ang. *equine asthma*, EA), z uwzględnieniem stopni nasilenia PLH (0–4) oraz obecności i nasilenia EA (brak EA; łagodna–umiarkowana astmy koni (ang. *mild–moderate equine asthma*, MEA); ciężka astma koni (ang. *severe equine asthma*, SEA)).

| PLH / EA    | Brak EA          | MEA               | SEA               | Suma            |
|-------------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| Stopień 0   | 6 (60,0%; 7,5%)  | 2 (8,7%; 2,5%)    | 0                 | 8 (10,0%)       |
| Stopień 1   | 4 (40,0%; 5,0%)  | 8 (34,8%; 10,0%)  | 11 (23,4%; 13,8%) | 23 (28,8%)      |
| Stopień 2   | 0                | 11 (47,8%; 13,8%) | 19 (40,4%; 23,8%) | 30 (37,5%)      |
| Stopień 3   | 0                | 2 (8,7%; 2,5%)    | 17 (36,2%; 21,3%) | 19 (23,8%)      |
| <b>Suma</b> | 10 (100%; 12,5%) | 23 (100%; 28,8%)  | 47 (100%; 58,8%)  | 80 (100%; 100%) |

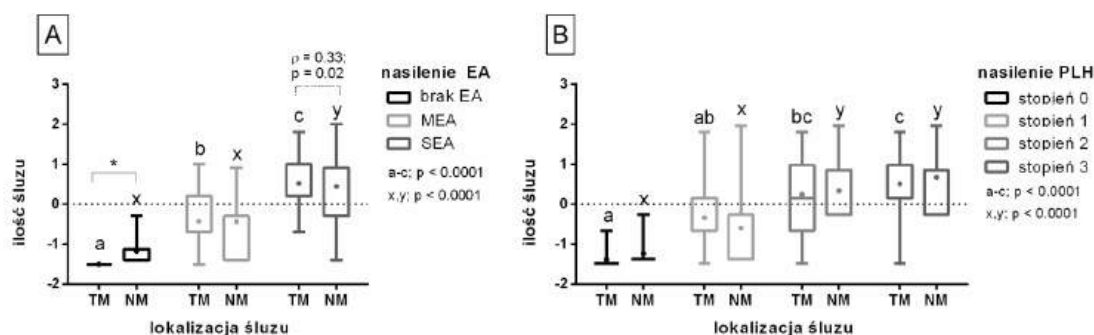
U koni z rozpoznaną EA, nasilenie objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni było istotnie większe w grupie z SEA niż w grupie z MEA. Z tego względu analizę zależności między nasileniem PLH i nasileniem objawów klinicznych przeprowadzono oddzielnie w obu grupach zależnych od EA. Jednak zarówno w grupie MEA jak i w grupie SEA nie stwierdzono istotnych różnic w nasileniu objawów klinicznych pomiędzy poszczególnymi stopniami PLH (rycina 9).



Rycina 9. Ocena ilościowa objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni z grudkowym zapaleniem gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH) i astmą koni (ang. *equine asthma*, EA), z uwzględnieniem stopni nasilenia PLH (0–4) oraz nasilenia EA (łagodna–umiarkowana astmy koni (ang. *mild–moderate equine asthma*, MEA); ciężka astma koni (ang. *severe equine asthma*, SEA)). Ocenę ilościową przedstawiono łącznie dla sumy objawów klinicznych. Gwiazdki oznaczają istotne różnice między grupami reprezentującymi nasilenie EA (A) i nasilenie PLH – u koni z MEA (B) i SEA (C) dla  $p < 0,05$ .

U koni wolnych od EA ilość śluzu była większa w nosogardzieli niż w tchawicy, podczas gdy u koni z MEA i SEA nie zaobserwowano istotnych różnic między tymi lokalizacjami. Jedynie u koni z SEA stwierdzono słabą, dodatnią korelację między ilością śluzu w tchawicy i ilością śluzu w nosogardzieli. Ilość śluzu w tchawicy była niska u koni wolnych od EA, wyższa u koni z MEA i najwyższa u koni z SEA, natomiast ilość śluzu w nosogardzieli była niższa u koni wolnych od EA i z MEA oraz wyższa u koni z SEA (rycina 10A).

Uwzględniając obecność i nasilenie PLH, nie stwierdzono różnicy w ilości śluzu w tchawicy i nosogardzieli w żadnym ze stopni PLH. W grupach tych nie stwierdzono również istotnych korelacji między ilością śluzu w tchawicy i nosogardzieli. Zarówno w tchawicy jak i w nosogardzieli ilość śluzu była mniejsza u koni wolnych od PLH (stopień 0) w porównaniu do z PLH stopnia 2–3. Dodatkowo, w tchawicy nie stwierdzono różnic między stopniami PLH 0 i 1 ani 1 i 2, natomiast w nosogardzieli nie stwierdzono różnic między stopniami PLH 0 i 1 oraz 2 i 3 (rycina 10B).



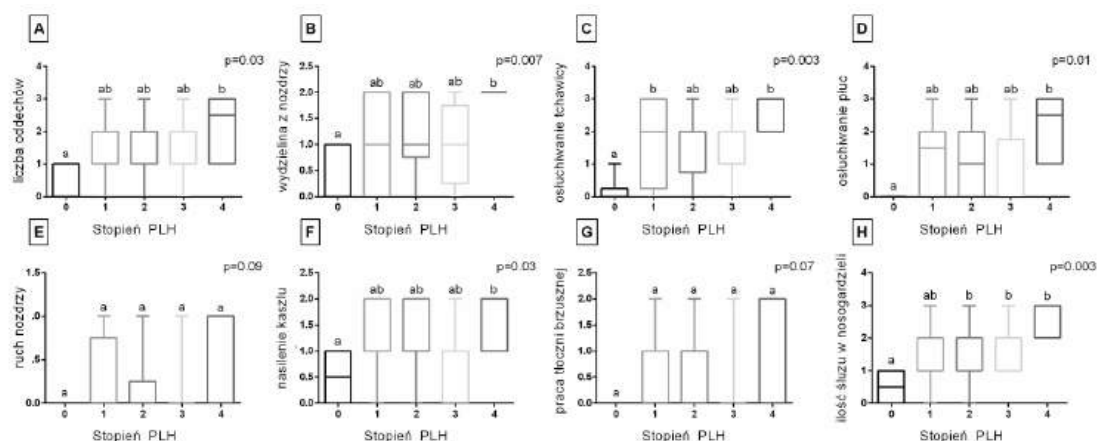
Rycina 10. Ocena ilościowa obecności śluzu w tchawicy (ang. *tracheal mucus*, TM) i śluzu w nosogardzieli (ang. *nasopharyngeal mucus*, NM) w zależności od obecności i stopnia nasilenia astmy koni (ang. *equine asthma*, EA) i grudkowego zapalenia gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH). Obecność śluzu przedstawiono dla koni wolnych od EA (Brak EA) oraz koni z łagodną–umiarkowaną astmą koni (ang. *mild–moderate equine asthma*, MEA) i ciężką astmą koni (ang. *severe equine asthma*, SEA))(A). Obecność śluzu przedstawiono dla koni wolnych z uwzględnieniem stopni nasilenia PLH (0–4) (B). Gwiazdki oznaczają istotne różnice między grupami reprezentującymi TM i NM;  $\rho$  i  $p$  oznaczają istotną korelację Spearmana między TM i NM, natomiast małe litery wskazują istotne różnice między grupami związanymi z EA i PLH przy  $p < 0,05$ .

Pozostałe wyniki uzyskane w niniejszym badaniu opisano szczegółowo w Kozłowska i in., 2024

### 5.3. Wyniki badań nad wspomaganą komputerowo diagnostyką grudkowego zapalenia gardła

Analiza ilościowa poszczególnych objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni oddechowych u koni z PLH wykazała, większe nasilenie objawów takich jak: liczba oddechów, wydzielina z nozdrzy, osłuchiwanie płuc i nasilenie kaszlu u koni ze stopniem 4 PLH w porównaniu z końmi bez zmian (stopień 0 PLH). Stwierdzono również większe nasilenie objawów uchwytnych podczas osłuchiwania tchawicy u koni ze stopniami PLH 1 i 4 niż u końmi bez zmian (stopień 0 PLH). Nie stwierdzono różnic między stopniami PLH w zakresie: ruchu nozdrzy i pracy tłoczni brzusznej. Ilość śluzu w nosogardzieli była mniejsza u koni wolnych od PLH (stopień 0) w porównaniu do z PLH stopnia 2–4 (rycina 11).



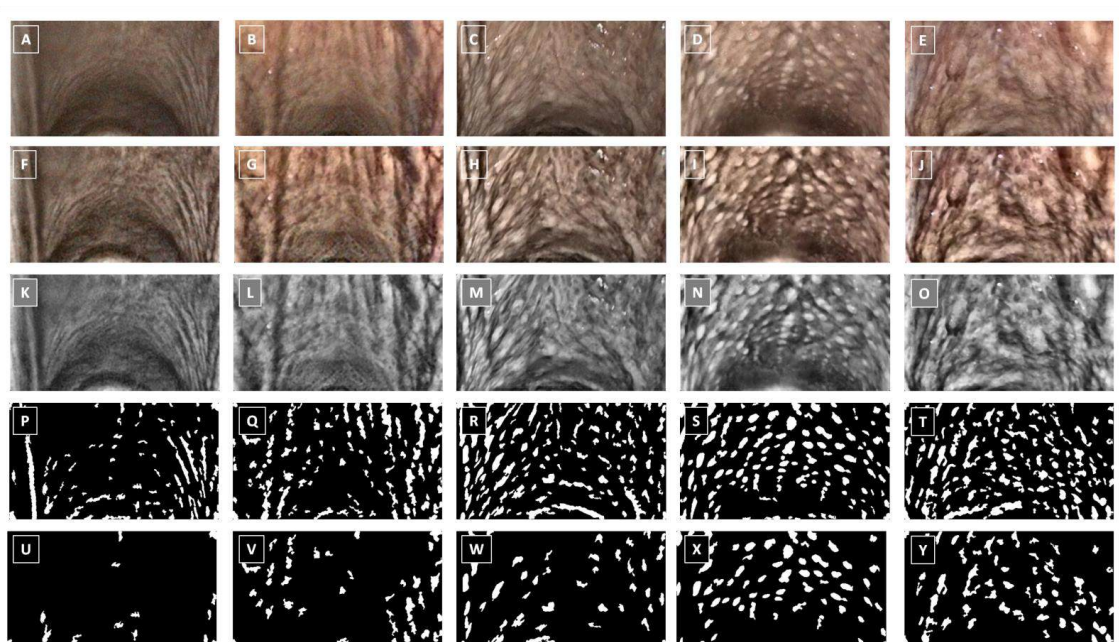


Rycina 11. Ocena ilościowa objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni z grudkowym zapaleniem gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH). Ocenę ilościową przedstawiono oddzielnie dla poszczególnych objawów: liczby oddechów (A), wydzieliny z noszdzy (B), osłuchiwania tchawicy (C), osłuchiwania płuc (D), ruchu noszdzy (E), obecności kaszlu (F), pracy tłoczni brzusznej (G) i obecności śluzu w nosogardzieli (H). Małe litery oznaczają istotne różnice między stopniami PLH (0–4) dla  $p < 0,05$ .

Liczba obiektów/grudek limfatycznych wykryta z wykorzystaniem zaproponowanej techniki przetwarzania cyfrowych obrazów endoskopowych była wyższa u koni ze stopniami 3–4 PLH w porównaniu do koni ze stopniami 0–2 PLH (tabela 8). Przykładowe obrazy wykrytych obiektów przedstawiono na rycinie 12.

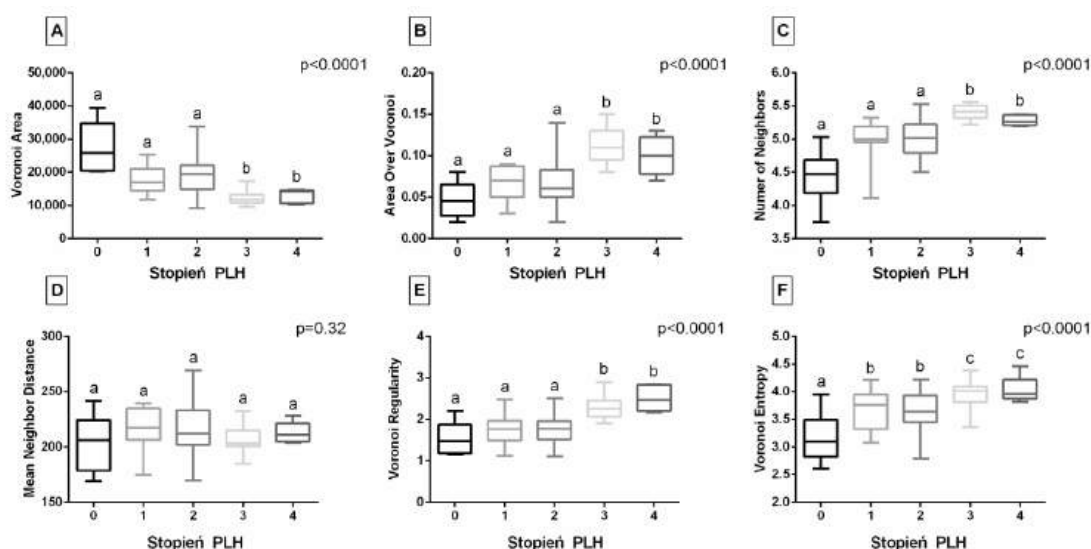
Tabela 8. Liczba obiektów odpowiadających grudkom limfatycznym na obrazach endoskopowych gardła koni z grudkowym zapaleniem gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH). Małe litery oznaczają istotne różnice między stopniami PLH (0–4) dla  $p < 0,05$ .

| Liczba<br>obiektów | PLH               |                   |                   |                   |                   |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                    | Stopień 0         | Stopień 1         | Stopień 2         | Stopień 3         | Stopień 4         |
| Mediana            | 18,0 <sup>a</sup> | 33,0 <sup>a</sup> | 30,5 <sup>a</sup> | 52,5 <sup>b</sup> | 50,5 <sup>b</sup> |
| Zakres (Min; Max)  | (12,0; 34,0)      | (19,0; 44,0)      | (15,0; 69,0)      | (32,0; 75,0)      | (37,0; 56,0)      |
| p                  | <0.0001           |                   |                   |                   |                   |



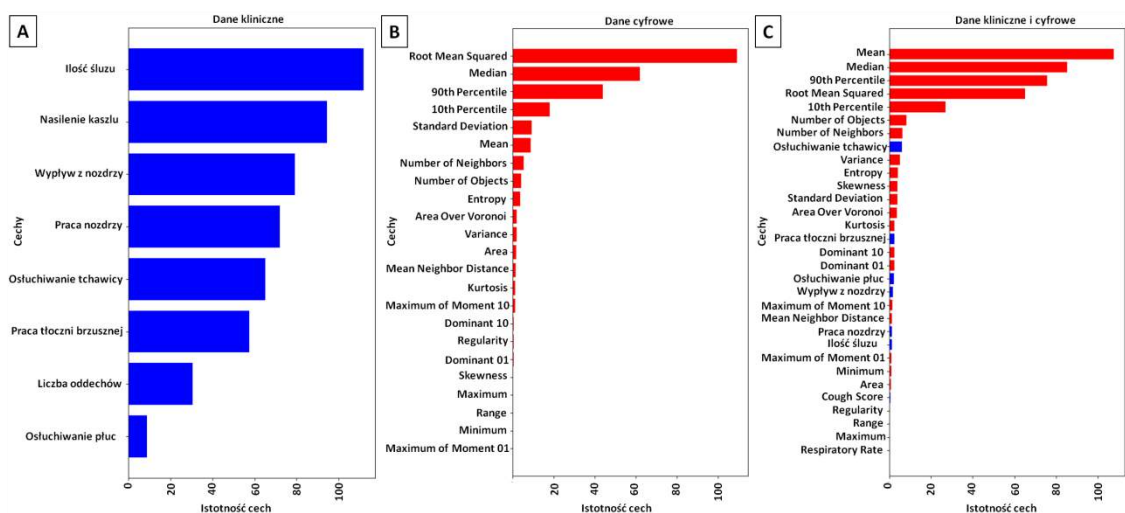
Rycina 12. Obrazy endoskopowe gardła koni z gruźkowym zapaleniem gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH) w stopniu 0 (A, F, K, P, U), w stopniu 1 (B, G, L, Q, V), w stopniu 2 (C, H, M, R, W), w stopniu 3 (D, I, N, S, X) oraz w stopniu 4 (E, J, O, T, Y). Przedstawiono kolejno: obrazy wyjściowe (A–E), obrazy po wzmocnieniu kontrastu (F–J), obrazy po przekształceniu do skali szarości (K–O), obrazy po wstępnym wykrywaniu obiektów (P–T) oraz obrazy po udoskonalonym wykrywaniu obiektów (U–Y).

Analiza ilościowa danych cyfrowych wykazała, niższą Voronoi Area u koni ze stopniem PLH 3–4 w porównaniu z końmi ze stopniem 0–2 oraz wyższe wartości cech geometrycznych obrazu takich jak: Area Over Voronoi, Number of Neighbors oraz Voronoi Entropy u koni ze stopniem 3–4 PLH niż u koni ze stopniem 0–3 PLH. Stwierdzono również wyższą wartość Voronoi Entropy u koni ze stopniem 1–2 PLH w porównaniu z końmi bez zmian (stopień 0 PLH). Nie stwierdzono istotnych różnic między stopniami PLH dla wartości Voronoi Regularity (rycina 13). Nie stwierdzono również istotnych różnic między stopniami PLH dla cech statystycznych obrazów endoskopowych gardła.



Rycina 13. Ocena ilościowa cech geometrycznych obrazów endoskopowych gardła koni z grudkowym zapaleniem gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH). Ocena ilościową przedstawiono oddzielnie dla poszczególnych cech: Voronoi Area (A), Area Over Voronoi (B), Number of Neighbors (C), Mean Neighbor Distance (D), Voronoi Regularity (E) i Voronoi Entropy (F). Małe litery oznaczają istotne różnice między stopniami PLH (0–4) dla  $p < 0,05$ .

Oceny istotności cech dla klasyfikacji PLH rozpatrywano dla trzech zestawach danych – danych klinicznych, danych cyfrowych oraz łączonych danych klinicznych i danych cyfrowych. Dla klasyfikacji PLH w oparciu jedynie o dane kliniczne najwyższą istotność wykazywały: ilość śluzu w nosogardzieli > nasilenie kaszlu > wydzielina z nozdrzy > ruch nozdrzy > objawy uchwytnie podczas osłuchiwania tchawicy. Dla klasyfikacji PLH w oparciu jedynie o dane cyfrowe najwyższą istotność wykazywały zarówno cechy statystyczne obrazów endoskopowych gardła – takie jak: Root Mean Squared > Median > 90th Percentile > 10th Percentile > Standard Deviation > Mean – oraz cechy geometryczne obrazów endoskopowych gardła – takie jak: Number of Neighbors > Number of Objects. Dla klasyfikacji PLH w oparciu o dane kliniczne i dane cyfrowe najwyższą istotność wykazywały: Mean > Median > 90th Percentile > Root Mean Squared > 10th Percentile > Number of Objects, Number of Neighbors > objawy uchwytnie podczas osłuchiwania tchawicy (rycina 14).



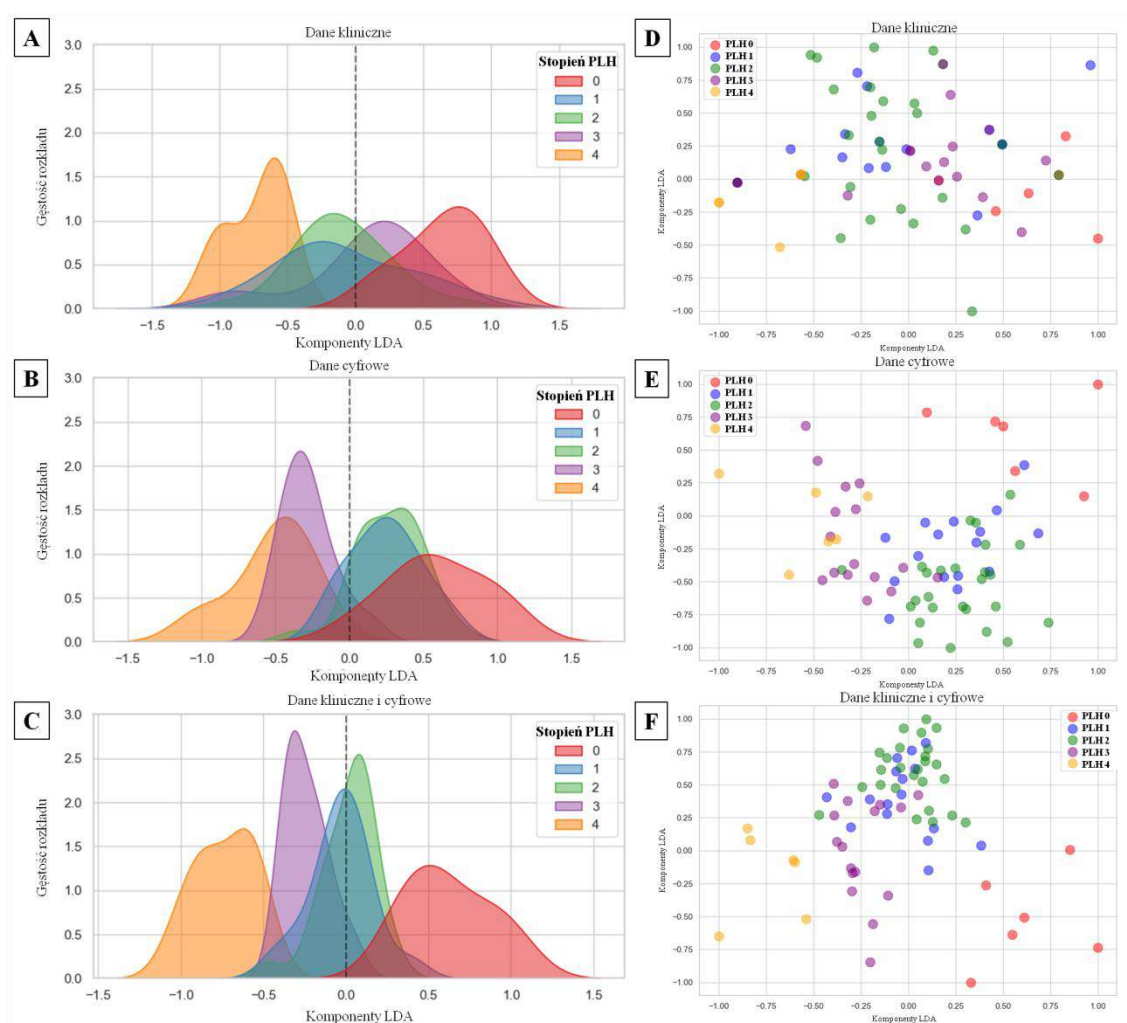
Rycina 14. Istotność cech w klasyfikacji grudkowego zapalenia gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH) dla trzech zestawów danych: danych klinicznych (A), danych cyfrowych (B) oraz łączonych danych klinicznych i danych cyfrowych (C).

Najlepsze wyniki klasyfikacji stopni PLH uzyskano w oparciu o dane kliniczne i dane cyfrowe (dokładność 0,76; precyzja 0,83; czułość 0,78;  $F1 = 0,76$ ). Należy podkreślić, że CAD oparta wyłącznie o badane dane cyfrowe charakteryzowała się niższą skutecznością, a CAD oparta wyłącznie o badane dane kliniczne charakteryzowała się najniższą skutecznością (Tabela 9).

Tabela 9. Metryki klasyfikacji (dokładność, precyzja, czułość, miara F1) grudkowego zapalenia gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH) w oparciu o trzy zestawy danych: dane kliniczne, dane cyfrowe oraz połączenie danych klinicznych i cyfrowych.

| Wskaźniki klasyfikacji | Dane kliniczne | Dane cyfrowe | Dane kliniczne i cyfrowe |
|------------------------|----------------|--------------|--------------------------|
| <b>Dokładność</b>      | 0,43           | 0,73         | 0,76                     |
| <b>Precyzja</b>        | 0,44           | 0,70         | 0,83                     |
| <b>Czułość</b>         | 0,44           | 0,69         | 0,78                     |
| <b>Miara F1</b>        | 0,41           | 0,65         | 0,76                     |

Największe nakładanie się komponentów LDA obserwowano dla danych klinicznych, gdzie klasy odpowiadające stopniom 1–3 PLH częściowo się pokrywały. Analiza danych cyfrowych ujawniła dwa obszary nakładania – stopni PLH 3 z 4 oraz stopni PLH 1 z 2. Po połączeniu danych klinicznych i cyfrowych obserwowano jedynie częściowe nakładanie klas 1 i 2 PLH, co wyjaśnia uzyskanie wyższych wartości metryk klasyfikacji dla tego zestawu danych. Podobne wzorce obserwowano na rozrzutu przestrzennego komponentów LDA, co potwierdza najlepsze rozdzielenie klas przy wykorzystaniu połączonego zestawu danych klinicznych i cyfrowych (rycina 15). Pozostałe wyniki uzyskane w niniejszym badaniu opisano szczegółowo w Kozłowska i in., 2025.



Rycina 15. Rozkład dwuwymiarowy (A–C) i przestrzenny (D–F) komponentów linowej analizy dyskryminacyjnej (ang. *linear discriminant analysis*, LDA) w modelu klasyfikacji grudkowego zapalenia gardła (ang. *pharyngeal lymphoid hyperplasia*, PLH) w oparciu o: dane kliniczne (A, D), dane cyfrowe (B, E), i dane łączone (C, F).

#### 5.4. Współwystępowanie chorób podniebienia miękkiego i astmy koni

EA i astma ludzi wykazuje liczne podobieństwa, dlatego EA została zaproponowana jako model zwierzęcy do badań nad mechanizmami przebudowy dróg oddechowych oraz do oceny skuteczności leczenia kwasem hialuronowym (Bullone & Lavoie, 2020). W tym kontekście pojawia się pytanie: czy koncepcja „*one airway – one disease*” może być również implementowana w medycynie weterynaryjnej?

W ostatnich latach nieliczne prace badawcze analizowały współwystępowanie chorób górnych i dolnych dróg oddechowych koni (Couroucé–Malblanc i in., 2010; Joó i in., 2021; Lane i in., 2010; Lo Feudo i in., 2022; Wysocka & Kluciński, 2018). Wysocka i in. stwierdzili częstsze występowanie PDs oraz NC u koni z MEA (Wysocka & Kluciński, 2018). Couroucé–Malblanc i in. wykazali zwiększoną częstość występowania DDSP u koni z MEA (Couroucé–Malblanc i in., 2010), natomiast Joó i in. wskazali SEA jako potencjalną pierwotną przyczynę DDSP (Joó i in., 2021). Dotychczas nie udało się jednoznacznie wykazać związku przyczynowego, a wyniki niektórych badań prowadzonych na koniach wyścigowych nie potwierdzają tej zależności (Davidson i in., 2011; Koblinger i in., 2011). W niniejszej pracy potwierdzono dużą częstość występowania zaburzeń PDs u koni z SEA.

Co więcej po wdrożeniu leczenia opartego na podawaniu leków steroidowych i leków rozszerzających oskrzela obserwowano zmniejszenie nasilenia objawów klinicznych zarówno SEA, jak i PDs. U koni z PDs przebieg kliniczny astmy był cięższy, a reakcja na terapię słabsza, co sugeruje, że występowanie PDs rośnie wraz z nasileniem SEA. Patofizjologia tego zjawiska pozostaje określona. Dostępna literatura sugeruje dwa możliwe mechanizmy: (1) rozprzestrzenianie się stanu zapalnego przez ciągłość nabłonka dróg oddechowych prowadzące do osłabienia mięśni podniebienia miękkiego, (2) wzrost podciśnienia w górnych drogach oddechowych wynikający ze zwiększonego oporu w dolnych drogach oddechowych (Art i in., 1990; Joó i in., 2021). Należy też podkreślić, że PDs mogą same w sobie prowadzić do kaskady zaburzeń aerodynamicznych w drogach oddechowych. Nawet niewielkie uniesienie podniebienia miękkiego nasila ujemne ciśnienie wdechowe, co dodatkowo pogłębia przemieszczenie (Cook, 2014).

W niniejszej pracy u wszystkich leczonych koni stwierdzono zmniejszenie nasilenia objawów zarówno PDs jak i SEA, co może potwierdzać wspólny komponent

zapalny obu chorób. Stwierdzono również, że podczas zaostrzeń objawy kliniczne i nasilenie zapalenia były silniejsze u koni z PDs, natomiast po leczeniu różnice te nie występowały. Ponadto, konie z PDs i SEA wykazywały słabszą odpowiedź kliniczną na leczenie niż konie bez PDs. Uzyskane wyniki sugerują, że częstość występowania PDs rośnie wraz z ciężkością EA.

W dostępnej literaturze sugerowano, że PI poprzedza rozwój DDSP (Holcombe & Ducharme, 2007), co potwierdzają wyniki prezentowanych badań. U wszystkich koni z DDSP stwierdzono równocześnie PI. Co więcej, częstość występowania PI była wyższa niż DDSP. Jednak po zastosowanym leczeniu objawy PI ustępowały, a objawy DDSP utrzymywały się. W czterech przypadkach przetrwałego DDSP po terapii SEA można hipotetycznie rozważać trwałe uszkodzenie funkcji nerwowo-mięśniowej podniebienia w wyniku przewlekłego procesu zapalnego. W badanej grupie wykluczono natomiast wady anatomiczne jako przyczynę PDs. Warto też uwzględnić, fakt że ekspozycja na kortykosteroidy,  $\beta$ 2-mimetyki i acetylocysteinę może dodatkowo powodować uszkodzenia komórek mięśniowych (Gehlen i in., 2008; Gosker i in., 2002). Obserwowane zmiany mogą więc być wieloczynnikowe i związane zarówno z przewlekłym zapaleniem, jak i działaniem leków.

W dotychczasowych badaniach wykazano, że wyniki cytologii TW i BALf dodatnio korelują z nasileniem objawów klinicznych chorób układu oddechowego koni (Christley i in., 2001). W przypadku nietolerancji wysiłkowej wykazano korelację tylko z wynikami BALf, uznawanymi za główny wskaźnik zapalenia dolnych dróg oddechowych (Christley i in., 2001; Holcombe i in., 2010). W niniejszej pracy – u koni z PDs – stwierdzono wyższy odsetek neutrofili zarówno w BALf, jak i w TW, co pozostaje zgodne z wcześniejszymi doniesieniami (Courouce-Malblanc i in., 2010). Istotnym spostrzeżeniem było to, że u koni z SEA i PDs odsetek neutrofili był wyższy w TW niż w BALf, podczas gdy u koni bez PDs wartości te były porównywalne. Ponieważ cytologia TW odzwierciedla stan zapalny tchawicy, a tchawica pozostaje w bezpośrednim kontakcie z górnymi drogami oddechowymi, uzyskane wyniki dodatkowo wspierają hipotezę szerzenia się procesu zapalnego w drogach oddechowych przez ciągłość tkanek. Ponadto wcześniejsze badania wykazały dużą zgodność mikrobioty górnych i dolnych dróg oddechowych u zdrowych koni (Bond i in., 2017). U koni z PDs odnotowaliśmy wyższy odsetek dodatnich hodowli bakteryjnych w TW niż u koni bez PDs. Ograniczeniami tej części badań była metoda pobierania próbek

(przez endoskop – z ryzykiem kontaminacji) oraz mała liczba koni z dodatnią hodowlą, co ogranicza znaczenie tych wyników w określaniu roli bakterii w etiologii.

Uzyskane wyniki sugerują związek pomiędzy SEA i PDs, jednak zależność ta wymaga dalszych badań. Należy podkreślić, że u koni z SEA objawy innych chorób dróg oddechowych mogą być pomijane, ponieważ diagnostyka i terapia koncentrują się przede wszystkim na dominujących dolegliwościach ze strony dolnych dróg oddechowych (Courouce–Malblanc i in., 2010). Z kolei PDs często leczone są chirurgicznie w celu poprawy wydolności wysiłkowej koni (Holcombe & Ducharme, 2007). Jednak ze względu na ryzyko związane ze znieczuleniem ogólnym, wysokie koszty leczenia chirurgicznego oraz niekiedy dyskusyjną skuteczność zabiegów operacyjnych na podniebieniu miękkim leczenie chirurgiczne nie zawsze jest wskazane jako leczenie pierwszego rzutu. Wyniki prezentowanych badań wskazują na to, że farmakoterapia przeciwzapalna może być rozważana jako alternatywa leczenia PDs – w szczególności PI, które ustępowało całkowicie po zastosowanym leczeniu. Można więc sugerować, że szczegółowa diagnostyka chorób górnych i dolnych dróg oddechowych powinna być wykonywana każdorazowo przed podjęciem decyzji o chirurgicznym leczeniu PDs, a w przypadku stwierdzenia współwystępowania zapalenia dolnych dróg oddechowych można zasugerować odłożenie w czasie decyzji o leczeniu chirurgicznym i rozpoczęcie farmakoterapii przeciwzapalnej. Zgodnie z koncepcją „*one airway – one disease*”, rozpoznanie współistniejących chorób, które mogą być pierwotną przyczyną PDs – takich jak EA – sprzyja uzyskaniu optymalnych efektów terapeutycznych przy minimalizacji ryzyka i kosztów leczenia.

### **5.5. Współwystępowanie grudkowego zapalenia gardła i astmy koni**

Zgodnie z koncepcją „*one airway – one disease*” każda choroba układu oddechowego powinna być rozpatrywana w szerszym kontekście, ze względu na możliwość współwystępowania powiązanych chorób (Grossman, 1997). Przykładowo, we wcześniejszych badaniach wykazano związek pomiędzy PLH stopnia 3 oraz wiotkością nagłośni i DDSP (Holcombe & Ducharme, 2007). W niniejszych badaniach wykazano wyższą częstość występowania PLH u koni z EA. Co ciekawe, nasilenie PLH nie był powiązany z nasileniem badanych objawów klinicznych chorób układu oddechowego typowych dla EA, choć PLH występowało u wszystkich koni z SEA. Mechanizm tej zależności wymaga dalszych badań. Można wstępnie zasugerować udział zapalenia rozprzestrzeniającego się poprzez ciągłość nabłonka dróg



oddechowych (Giovannini–Chami i in., 2018), który prowadzi do aktywacji tkanki limfatycznej gardła stanowiącej pierwszą linię obrony przed patogenami wziewnymi. Możliwym jest że czynniki wyzwalające EA, zwłaszcza podczas jej zaostrzeń, mogą również brać udział w patogenezie PLH.

EA jest chorobą nieuleczalną i postępującą, w której wraz z upływem lat dochodzi do nasilania objawów klinicznych, zwłaszcza w przypadku braku odpowiedniego leczenia i kontroli środowiskowej (Couëtil i in., 2016). Zjawisko to może być potwierdzone poprzez dodatnią korelację pomiędzy nasileniem choroby, a wiekiem koni. PLH najczęściej opisywane jest u młodych koni (< 5. roku życia). W tym wieku PLH uznaje się je za zjawisko o ograniczonym znaczeniu klinicznym, będące reakcją tkanki limfatycznej gardła na alergenów środowiskowe lub czynniki infekcyjne (Holcombe & Ducharme, 2007). Liczne doniesienia sugerują, że w tej grupie wiekowej PLH występuje z większą częstością i ma charakter przejściowy (Raker & Boles, 1978). W prezentowanych wynikach nie potwierdzono wyższej zapadalności na PLH wśród młodych koni, co może wynikać z faktu, że analizowana populacja obejmowała głównie osobniki starsze. Wynik ten wskazuje, że wiek nie musi być czynnikiem decydującym o obecności PLH, a istotniejszą rolę w patogenezie choroby mogą odgrywać inne czynniki – takie jak warunki środowiskowe, intensywność użytkowania koni czy współwystępowanie chorób dolnych dróg oddechowych – w tym EA.

Powszechnie przyjmuje się, że PLH rozwija się wskutek ekspozycji na antygeny środowiskowe i infekcyjne przenoszone aerogennie. Natomiast zaostrzenia EA są wywoływane przez specyficzne czynniki wyzwalające astmę u osobników predysponowanych (Couëtil i in., 2016; Holcombe & Ducharme, 2007). Rola czynników infekcyjnych w patogenezie EA pozostaje niewyjaśniona i wymaga dalszych badań. Zarówno infekcje bakteryjne, jak i wirusowe mogą być powiązane z rozwojem PLH oraz EA, jednak aktualne opinie w tym zakresie pozostają rozbieżne (Couëtil i in., 2016). Podobnie, skład mikrobioty dolnych dróg oddechowych został powiązany z patogenezą EA u młodych koni wyścigowych (Clarke i in., 1987; Van Cleemput i in., 2019), choć u starszych osobników zależność ta nie została potwierdzona (Lo Feudo i in., 2021). Lo Feudo i in. wykazali, że konie z MEA częściej miały dodatnie wyniki bakteriologii w porównaniu z końmi z SEA, co może wskazywać na związek pomiędzy wiekiem, a rozwojem odporności (Lo Feudo i in., 2021, 2022). Co istotne, nie

odnotowano jednak związku pomiędzy występowaniem PLH, a wynikami hodowli bakteryjnych. Van Cleemput i in. wykazali, że proteazy pochodzące z kurzu mogą naruszać integralność nabłonka oddechowego, ułatwiając zakażenie EHV typu 1 (Van Cleemput i in., 2019). Wyniki te są zgodne z obserwacjami Cooka (Cook, 1974) oraz Blakeslee i in. (Blakeslee Jr. i in., 1975), którzy potwierdzili korelację pomiędzy zakażeniami EHV– 2, a wzrostem odsetka neutrofilów w TW. Co więcej, badaniami Clarke i in. sugerują, że PLH może stanowić następstwo infekcji wirusowej (Clarke i in., 1987).

W niniejszej pracy nie badano wpływu infekcji bakteryjnych i wirusowych na występowanie EA i PLN. Badano natomiast i potwierdzono (Clarke i in., 1987) wpływ warunków środowiskowych na występowanie choroby. Wykazano, że cięższe objawy kliniczne EA obserwowano u koni utrzymywanych w stajniach o słabej wentylacji i rzadko sprzątanym. Z kolei karmienie moczonym sianem wiązało się z łagodniejszym przebiegiem choroby, choć u koni otrzymujących jednocześnie moczony siano i pasze treściwe nie stwierdzono istotnych korelacji. Może to wynikać z małej liczby badanych koni lub z jakości stosowanych pasz. Wcześniejsze badania wskazywały, że jakość pasz treściwych odgrywa istotną rolę w utrzymaniu zdrowia układu oddechowego, gdyż wentylacja stajni nie eliminuje ryzyka narażenia na pył podczas pobierania pokarmu (Sliwinski i in., 2005). Intemann i in. wykazali, że pasze treściwe są ważnym źródłem alergenów wziewnych i mogą indukować kaszel (Intemann i in., 2022). Vandenput i in. wskazali natomiast, że pasze treściwe odgrywają jedynie marginalną rolę w emisji alergenów, ze względu na bardzo niską emisję pyłu (Vandenput i in., 1997). Niemniej jednak, możliwy związek pomiędzy jakością pasz treściwych, a występowaniem chorób układu oddechowego wciąż jest sugerowany. W niniejszych badaniach stwierdzono dodatnią korelację pomiędzy nasileniem PLH a: (1) karmieniem sianem moczonym i paszami treściwymi, (2) utrzymywaniem w boksach angielskich, (3) częstym sprzątaniem stajni oraz (4) przechowywaniem słomy i siana na zewnątrz. Sugeruje to, że składniki kurzu mogą inicjować PLH, choć opinie badaczy w tym zakresie są podzielone. Bagshaw i in. wykazali związek nasilenia PLH z lokalizacją toru wyścigowego na którym trenowały młode konie pełnej krwi angielskiej w miejscu eksponowanym na zapylenie (Bagshaw i in., 2023). Natomiast Clarke i in. nie stwierdzili zależności pomiędzy złymi warunkami środowiskowymi, a PLH u koni 2–letnich koni pełnej krwi (Clarke i in., 1987).

Zarówno EA jak i PLH wykazują powiązania z chorobami górnych dróg oddechowych. W przebiegu EA skurcz oskrzeli, nagromadzenie śluzu oraz przebudowa ściany dróg oddechowych prowadzą do zwiększenia ujemnego ciśnienia w drogach oddechowych (Couetil i in., 2020). Błona śluzowa krtani zawiera liczne receptory wrażliwe na zmiany ciśnienia, które podczas obturacji przekazują sygnały aferentne do ośrodkowego układu nerwowego, wywołując skurcz mięśni górnych dróg oddechowych (Holcombe i in., 2001). W błonie śluzowej gardła zlokalizowane są mechanoreceptory gałęzi gardłowej nerwu błędnego, odgrywające istotną rolę w utrzymaniu prawidłowej funkcji nosogardzieli (Tessier, 2006). Sugeruje się, że stan zapalny w tym obszarze może predysponować do zapadania nosogardzieli, DDSP oraz zapadania fałdów nalewkowo–nagłośniowych (Tessier, 2006). Obecność grudek chłonnych na ścianie gardła dodatkowo zmniejsza światło dróg oddechowych, co nasila ujemne ciśnienie podczas wdechu i może prowadzić do zapadania tylnej ściany gardła oraz unoszenia podniebienia miękkiego (Raker & Boles, 1978). Jeżeli EA i PLH często współwystępują, obie jednostki mogą odgrywać istotną rolę w patofizjologii chorób górnych dróg oddechowych. Co więcej, obserwuje się, że częstość występowania PLH oraz niektórych zaburzeń dynamicznych górnych dróg oddechowych zmniejsza się wraz z wiekiem koni (Holcombe & Ducharme, 2007).

Nagromadzenie śluzu w tchawicy zostało skorelowane z nasileniem objawów klinicznych (Simões & Tilley, 2023), nasileniem kaszlu (Gerber, Straub, i in., 2004), wynikami badań cytologicznych (Gerber, Straub, i in., 2004) oraz obniżoną wydolnością wysiłkową koni (Holcombe i in., 2006). Produkcja śluzu może być indukowana zarówno przez stan zapalny, jak i bezpośrednio przez czynniki drażniące – bakterie, wirusy i środowiskowe. Jej nasilenie zależy również od wieku konia, kondycji układu oddechowego oraz warunków środowiskowych w których bytuje koń – w tym temperatury i wilgotności powietrza (Gerber i in., 2003; Gerber i in., 2004; Hansen i in., 2018). W prezentowanych badaniach nie stwierdzono jednoznacznej zależności pomiędzy warunkami utrzymania, a nagromadzeniem śluzu w tchawicy. Odnotowano jedynie słabe korelacje (zarówno dodatnie jak i ujemne) z jakością wentylacji stajni i stosowaniem moczzonego siana. Wyniki te są zgodne z obserwacjami Koblingera i in., którzy również nie potwierdzili istotnej roli środowiska w tym zakresie (Koblinger i in., 2011).

Co istotne, prezentowane badanie po raz pierwszy wykazało wyraźny związek pomiędzy warunkami środowiskowymi, a nagromadzeniem śluzu w nosogardzieli. Stwierdzono słabe ujemne korelacje pomiędzy ilością śluzu, a karmieniem wyłącznie moczonym sianem, utrzymywaniem koni w boksach z dostępem do wybiegu lub okna, dobrą lub bardzo dobrą wentylacją, dwukrotnym sprzątaniem stajni w ciągu doby oraz przechowywaniem paszy i ściółki poza stajnią. Z kolei słabe korelacje dodatnie zaobserwowano pomiędzy nagromadzeniem śluzu w nosogardzieli, a sprzątaniem stajni rzadziej niż raz dziennie oraz przechowywaniu paszy i ściółki w stajni. Wyniki te mogą sugerować częściową niezależność mechanizmów wydzielania śluzu w górnych i dolnych drogach oddechowych w odpowiedzi na czynniki środowiskowe.

W niniejszej pracy nagromadzenie śluzu w tchawicy i nosogardzieli zwiększało się wraz z nasileniem objawów EA, co jest zgodne z wynikami zaprezentowanymi przez Couëttil i in. (Couëttil i in., 2001b). Nagromadzenie śluzu w tchawicy i nosogardzieli zwiększało się również wraz ze wzrostem nasilenia PLH, co jest zgodne z badaniami Holcombe i in. (Holcombe i in., 2006). Jednak korelacje pomiędzy tymi lokalizacjami były słabe. Jedynie w przypadku SEA stwierdzono słabą dodatnią korelację, co może sugerować, że nadmierna produkcja śluzu w tchawicy prowadzi do jego wtórnej akumulacji w nosogardzieli podczas odkrztuszania (Couëttil i in., 2001b). Ograniczona liczba i siła korelacji między tymi lokalizacjami może wskazywać na częściową niezależność procesów zapalnych w górnych i dolnych drogach oddechowych, co jest zgodne z wynikami badań Koblingera i in. (Koblinger i in., 2011). Wykazano również, że drażnienie receptorów nosogardzieli i krtani może zwiększać wydzielanie śluzu w tchawicy poprzez pobudzanie odruchów przewodzonych przez nerw językowo–gardłowy, nerw krtaniowy górny oraz nerw błędny (Phipps & Richardson, 1976; Rothe & Karrer, 1998).

#### **5.6. Wspomagana komputerowo diagnostyka grudkowego zapalenia gardła**

W niniejszej pracy wykorzystano technologię CAD – dobrze poznaną w medycynie człowieka (Ahmad i in., 2017; Mukhtorov i in., 2023) – w diagnostyce PLH. Jej celem była obiektywizacja procesu diagnostycznego oraz uzupełnienie luki w wiedzy dotyczącej tego schorzenia u starszych osobników.

Dotychczasowe badania nad występowaniem PLH skupiały się przede wszystkim na młodych koniach wyścigowych (Auer i in., 1985; Bagshaw i in., 2023;

Kaiseler i in., 2012; Saulez & Gummow, 2009), podczas gdy populacja koni starszych nie została tak szeroko zbadana. Sweeney i in. stwierdzili obecność PLH u 14% koni powyżej 5. roku życia (Sweeney i in., 1991), podczas gdy Wichtel i in. zaobserwowali PLH u 47% koni w wieku 2–14 lat (Wichtel i in., 2016). W kilku badaniach wykazano, że u koni 2–letnich częściej występuje cięższa postać PLH (stopień 3–4) w porównaniu z końmi 3–letnimi i starszymi (Auer i in., 1985; Kaiseler i in., 2012). Podobne wyniki uzyskali Wichtel i in., którzy w grupie koni w wieku 2–14 lat stwierdzili, że osobniki z wyższymi stopniami PLH były istotnie młodsze niż konie ze stopniem 0 (Wichtel i in., 2016). W prezentowanych badaniach obejmującym populację koni powyżej 5. roku życia wykazano, że konie ze stopniami PLH 2, 3 i 4 były znacząco młodsze niż osobniki bez zmian (PLH 0). Wynik ten jest zgodny z obserwacjami Robinsona i in., którzy wskazali wiek jako jedyny istotny czynnik ryzyka PLH (Robinson i in., 2009).

Warto zauważyć, że tylko dwa badania oceniały częstość występowania PLH u dorosłych koni. W jednym z nich PLH stwierdzono u 8,2% dorosłych koni (wiek średni  $\pm$  SD: 8,7  $\pm$  2,6 roku) (Gajarlwar i in., 2020), natomiast w drugim u 90,0% dorosłych koni (wiek średni  $\pm$  SD: 12,9  $\pm$  4,6 roku) (Kozłowska i in., 2024). Podobnie w prezentowanym badaniu, powiązanym z poprzednią publikacją (Kozłowska i in., 2024), PLH stwierdzono u 91,4% dorosłych koni skierowanych do kliniki z powodu chorób układu oddechowego. Tak duża rozbieżność częstości występowania może wynikać z różnic metodologicznych – w pierwszym badaniu PLH i zapalenie gardła liczono osobno, podczas gdy w drugim traktowano je łącznie. Ponadto badanie to obejmowało również konie 4–letnie, co mogło znacząco zawyżyć częstość PLH, zważywszy że Saulez i in. stwierdzili PLH u 63,1% zdrowych koni 4–letnich (Saulez & Gummow, 2009).

W niniejszym badaniu zaobserwowano, że u koni z PLH stopnia 2–4 ilość śluzu w nosogardzieli była wyższa niż u koni zdrowych. W większości wcześniejszych badań, uwzględniających PLH i obecność śluzu, oceniano ilość śluzu w tchawicy (Clarke i in., 1987; Holcombe i in., 2006). Natomiast w naszym prezentowanych badaniach analizowano nagromadzenie śluzu w nosogardzieli. Nasze wcześniejsze obserwacje wskazywały, że u koni z PLH ilość śluzu w tchawicy i nosogardzieli zmienia się wraz z nasileniem PLH (Kozłowska i in., 2024), tym samym wyniki niniejszego badania mogą pośrednio odzwierciedlać również akumulację śluzu w dolnych drogach oddechowych. Clarken i in. nie wykazali związku pomiędzy obecnością i nasileniem PLH, a ilością

śluzu w tchawicy (Clarke i in., 1987), natomiast Holcombe i in. Odnotowali wzrost ilości śluzu w tchawicy powiązany ze wzrostem nasilenia PLH (Holcombe i in., 2006).

W prezentowanych badaniach wykazano wzrost nasilenia objawów klinicznych chorób układu oddechowego – w tym liczby oddechów, wydzielina z nozdrzy oraz nasilenia kaszlu – wraz ze wzrostem nasilenia PLH. W niektórych badaniach nie uznano kaszlu jako objawu klinicznego PLH (Holcombe i in., 2006; Robinson i in., 2006). Natomiast w innych badaniach stwierdzono częste epizody kaszlu u koni z zapaleniem gardła (Gajjarlwar i in., 2020) oraz u koni z PLH w stopniach 3–4 (Kaiseler i in., 2012), co przemawia jednak za potrzebą uwzględniania PLH w diagnostyce różnicowej kaszlu. Obserwacja ta znajduje uzasadnienie w koncepcji „*one airway – one disease*”, która akcentuje anatomiczną ciągłość i funkcjonalną integrację układu oddechowego. Kaszel jest bowiem odruchem wyzwalanym przez pobudzenie receptorów zlokalizowanych na dowolnym odcinku dróg oddechowych – od gardła aż po oskrzela (Couetil i in., 2001b). Warto jednak zauważyć, że w naszym badaniu częstość oddechów, wydzielina z nozdrzy oraz punktacja kaszlu nie osiągnęły wystarczającej wartości cechy i nie zostały uwzględnione w modelu klasyfikacji (Butler i in., 1993).

Edvans i in. wykazali, że obecność patologicznego szmeru oddechowego u koni z PLH. W tych przypadkach PLH było jedyną zdiagnozowaną chorobą oddechową (Evans i in., 2011). Podobnie prezentowanym badaniu objawy uchwytnie podczas osłuchiwania tchawicy były bardziej nasilone u koni z PLH stopnia 1 i 4 niż u koni zdrowych, a objawy uchwytnie podczas osłuchiwania płuc była bardziej nasilone u koni z PLH stopnia 4. Kannegieter i in. zasugerowali, że nasilenie PLH i chorób współwystępujących może przyczyniać się do niewydolności oddechowej (Kannegieter & Dore, 1995). Autorzy ci rekomendowali uwzględnianie PLH jako możliwej przyczyny niewydolności oddechowej. Co istotne, spośród wszystkich ocenianych danych klinicznych i danych cyfrowych uwzględnianych w proponowanym modelu CAD jedynie osłuchiwanie tchawicy osiągnęło wysoką istotność i została uwzględniona w modelu klasyfikacji (Butler i in., 1993). Warto zauważyć, że integracja danych klinicznych i danych cyfrowych pozwoliła na uzyskanie wyższej skuteczności klasyfikacji w porównaniu z wykorzystaniem pojedynczego zbioru danych. Należy podkreślić, że przy klasyfikacji PLH opartej wyłącznie na danych klinicznych algorytm RF uwzględniał – poza osłuchiowaniem tchawicy – również ilość śluzu, nasilenie kaszlu, wydzielinę z nozdrzy i pracę nozdrzy, oprócz osłuchiwania górnych dróg oddechowych.

Uzyskany model charakteryzował się jednak niską skutecznością, niewystarczającą do uznania CAD za efektywny. W przypadku klasyfikacji opartej wyłącznie na danych cyfrowych algorytm RF uzyskał wyższą – choć nadal niewystarczającą – skuteczność klasyfikacji. Co istotne, w modelu tym najwyższą istotność osiągnęły cechy statystyczne i geometryczne obrazów endoskopowych gardła uwzględnione również w najbardziej skutecznym modelu łączonym. Szczególne znaczenie miały dwie cechy geometryczne – liczba obiektów oraz liczba sąsiadujących obiektów (Huang i in., 2018; Lau i in., 2021; Sudbø i in., 2000). Uzyskane wyniki wskazują, że technologia oparta na wykrywaniu obiektów umożliwia skuteczną identyfikację i segmentację grudek limfatycznych gardła umożliwiając implementację CAD w diagnostyce klinicznej PLH.

Warto zauważyć, że zarówno liczba obiektów/grudek limfatycznych jak i liczba sąsiadujących obiektów/ grudek limfatycznych była wyższa u koni z PLH w stopniach 3–4 w porównaniu do koni zdrowych i koni z PLH w stopniu 1–2. Natomiast żaden z cech zwracanych przez FOS – która uzyskała wysoką istotność w modelu klasyfikatora – nie różniła się istotnie pomiędzy poszczególnymi stopniami PLH. Uzyskane wyniki wskazują, że tekstura obrazu endoskopowego ściany gardła – chociaż nieuchwytna w ocenie wizualnej – odgrywa rolę w cyfrowym różnicowaniu stopni PLH. Wskazane są zatem dalsze badania z wykorzystaniem bardziej rozbudowanych metod oceny tekstury obrazu – takich jak statystyki drugiego rzędu (ang. *second order statistics*, SOS) i metody oparte na analizie entropii (Bębas i in., 2025). W dalszych badaniach nad zastosowaniem CAD w ocenie obrazów endoskopowych gardła koni wskazane jest również przetestowanie innych nadzorowanych algorytmów uczenia maszynowego, takich jak algorytm k najbliższych sąsiadów (ang. *k-nearest neighbors*, kNN) (Bębas i in., 2025; Xing i in., 2018) czy algorytm maszyny wektorów nośnych (ang. *support vector machine*, SVM) (Bębas i in., 2021; Li & Meng, 2012), które są wysokowydajne w CAD obrazów biomedycznych w medycynie ludzkiej.

Zaproponowany model CAD może przynieść wymierne korzyści kliniczne obejmujące m.in. usprawnienie badań przesiewowych dużych populacji koni, dokładniejszą identyfikację osobników z PLH, monitorowanie treningu młodych koni, ograniczenie obciążeń koni starszych z PLH, wcześniejsze wdrażanie leczenia PLH, śledzenie progresji lub regresji PLH oraz wspieranie diagnostyki współistniejących chorób układu oddechowego koni. W konsekwencji może to przyczynić się do szybszej rekonwalescencji oraz poprawy dobrostanu koni.

## **6. Weryfikacja hipotez badawczych**

Uzyskane wyniki pozwoliły na potwierdzenie następujących hipotez:

### **Hipoteza 1**

PI i DDSP występują częściej u koni z SEA niż u koni bez SEA (Kozłowska i in., 2023).

### **Hipoteza 2**

U koni z PI i DDSP przebieg SEA jest cięższy niż u koni bez PI i DDSP (Kozłowska i in., 2023).

### **Hipoteza 3**

Skuteczne leczenie SEA prowadzi do poprawy stanu klinicznego konia zarówno w zakresie objawów SEA jak i objawów PI i DDSP (Kozłowska i in., 2023).

### **Hipoteza 4**

PLH występuje częściej u koni z EA niż u koni bez EA (Kozłowska i wsp., 2024).

### **Hipoteza 6**

U koni z SEA nasilenie PLH jest większe niż u koni z MEA (Kozłowska i wsp., 2024).

### **Hipoteza 7**

Objawy endoskopowe PLH mogą być kwantyfikowane i poddawane analizie komputerowej (Kozłowska i wsp., 2025).

### **Hipoteza 8**

Techniki przetwarzania obrazów endoskopowych oparta na wykrywaniu obiektów umożliwia CAD nasilenia PLH (Kozłowska i wsp., 2025).

Uzyskane wyniki pozwoliły również na odrzucenie następujących hipotez:

### **Hipoteza 5**

U koni z PLH przebieg EA jest cięższy niż u koni bez PLH (Kozłowska i wsp., 2024).



## 7. Wnioski

[P.1] Zaawansowane metody obrazowania, takich jak CT i MR wraz z badaniami czynnościowymi układu oddechowego znacząco poszerzają możliwości diagnostyczne chorób układu oddechowego koni. Jednak ich powszechne zastosowanie kliniczne pozostaje ograniczone i wymaga dalszych badań, walidacji i opracowania znormalizowanych protokołów klinicznych. Dlatego szczegółowe badanie kliniczne oraz badanie endoskopowe pozostaje złotym standardem w diagnostyce chorób górnych i dolnych dróg oddechowych (Kozłowska i in., 2022).

[P.2] Częstość występowania PDs i nasilenie objawów klinicznych chorób układu oddechowego jest wyższa u koni z SEA przed rozpoczęciem farmakologicznego leczenia niż po jego zakończeniu. Ponadto leczenie SEA zmniejsza występowanie PI, co wskazuje na kluczową rolę procesu zapalnego w patogenezie EA i PDs. Potwierdza to zasadność farmakoterapii przeciwzapalnej jako terapii pierwszego rzutu w leczeniu chorób górnych i dolnych dróg oddechowych koni (Kozłowska i in., 2023).

[P.3] Częstość występowania PLH jest wyższa u koni z EA niż u koni wolnych od choroby i wzrasta wraz z nasileniem EA, co wskazuje na potencjalny związek obu chorób zgodny z koncepcją „*one airway – one disease*”. Jednak PLH nie nasila bezpośrednio objawów klinicznych EA, chociaż wraz z nasileniem PLH wzrasta ilość śluzu zarówno w górnych jak i dolnych drogach oddechowych (Kozłowska i in., 2024).

[P.4] Zaproponowanej techniki przetwarzania obrazów cyfrowych oparta na wykrywaniu obiektów pozwala na kwantyfikację objawów endoskopowych PLH oraz zastosowanie uzyskanych danych cyfrowych w skutecznej CAD choroby. Jednak trafność klasyfikacji stopni PLH wzrasta wraz z włączeniem danych klinicznych do modelu klasyfikatora co wskazuje na potrzebę rozwoju technologii cyfrowych w łączności z oceną stanu klinicznego pacjenta (Kozłowska i in., 2025).

## 8. Literatura

1. Acevedo-Prado, A., Seoane-Pillado, T., López-Silvarrey-Varela, A., Salgado, F.-J., Cruz, M.-J., Faraldo-García, A., Nieto-Fontarigo, J.-J., Pértiga-Díaz, S., Sanchez-Lastres, J., San-José-González, M.-A., Bamonde-Rodríguez, L., Garnelo-Suárez, L., Pérez-Castro, T., Sampedro-Campos, M., & Gonzalez-Barcala, F.-J. (2022). Association of rhinitis with asthma prevalence and severity. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10448-w>
2. Adebisi, M. O., Arowolo, M. O., Mshelia, M. D., & Olugbara, O. O. (2022). A Linear Discriminant Analysis and Classification Model for Breast Cancer Diagnosis. *Applied Sciences*, 12(22), 11455. <https://doi.org/10.3390/app122211455>
3. Ahmad, J., Muhammad, K., Lee, M. Y., & Baik, S. W. (2017). Endoscopic Image Classification and Retrieval using Clustered Convolutional Features. *Journal of Medical Systems*, 41(12), 196. <https://doi.org/10.1007/s10916-017-0836-y>
4. Ainsworth, D. M., & Hackett, R. P. (2004). Disorders of the Respiratory System. *Equine Internal Medicine*, 289–353. <https://doi.org/10.1016/B0-72-169777-1/50009-3>
5. Ambrisko, T. D., Schramel, J. P., Adler, A., Kutasi, O., Makra, Z., & Moens, Y. P. S. (2015). Assessment of distribution of ventilation by electrical impedance tomography in standing horses. *Physiological Measurement*, 37(2), 175–186. <https://doi.org/10.1088/0967-3334/37/2/175>
6. Arencibia, A., Corbera, J. A., Ramírez, G., Díaz-Bertrana, M. L., Pitti, L., Morales, M., & Jaber, J. R. (2020). Anatomical Assessment of the Thorax in the Neonatal Foal Using Computed Tomography Angiography, Sectional Anatomy, and Gross Dissections. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 10(6), 1045. <https://doi.org/10.3390/ani10061045>
7. Art, T., Anderson, L., Woakes, A. J., Roberts, C., Butler, P. J., Snow, D. H., & Lekeux, P. (1990). Mechanics of breathing during strenuous exercise in thoroughbred horses. *Respiration Physiology*, 82(3), 279–294. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(90\)90098-J](https://doi.org/10.1016/0034-5687(90)90098-J)
8. Ashwini, S., Arunkumar, J., Prabu, T., Singh, N., & Singh, N. (2023). Diagnosis and multi-classification of lung diseases in CXR images using optimized deep convolutional neural network. *Soft Computing*, 28, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00500-023-09480-3>
9. Auer, D. E., Wilson, R. G., & Groenendyk, S. (1985). Pharyngeal lymphoid hyperplasia in Thoroughbred racehorses in training. *Australian Veterinary Journal*, 62(4), 124–126. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1985.tb07259.x>
10. Auer, U., Schramel, J., Moens, Y., Mosing, M., & Braun, C. (2018). Monitoring changes in distribution of pulmonary ventilation by functional electrical impedance tomography in anaesthetized ponies. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 46. <https://doi.org/10.1016/j.vaa.2018.09.048>
11. Babenko, V., Nastenka, I., Pavlov, V., Horodetska, O., Dykan, I., Tarasyuk, B., & Lazoryshynets, V. (2023). Classification of Pathologies on Medical Images Using the Algorithm of Random Forest of Optimal-Complexity Trees. *Cybernetics and Systems Analysis*, 346–358. <https://doi.org/10.1007/s10559-023-00569-z>

12. Bagshaw, J., Sanz, M., Wang, Y., Shoemaker, S., & Bayly, W. (2023). *Severity and effects of pharyngeal lymphoid hyperplasia vary with age and racetrack location in Thoroughbred racehorses*. <https://doi.org/10.1163/17552559-20220070>
13. Bakıcı, C., Batur, B., Akgün, R., Kaya, U., Ekim, O., Oto, Ç., & Hazıroğlu, R. (2022). Computer-aided three dimensional morphometric measurements of cervical vertebrae variations compared with manual measurements in throughbred horses. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences*, 38, 41–49. <https://doi.org/10.15312/EurasianJVetSci.2022.363>
14. Balasuriya, U. B. R. (2014). Equine viral arteritis. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 30(3), 543–560. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.011>
15. Banik, D., Roy, K., Bhattacharjee, D., Nasipuri, M., & Krejcar, O. (2020). Polyp-Net: A Multi-model Fusion Network for Polyp Segmentation. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, PP, 1–1. <https://doi.org/10.1109/TIM.2020.3015607>
16. Barakzai, S. Z., & Hawkes, C. S. (2010). Dorsal displacement of the soft palate and palatal instability. *Equine Veterinary Education*, 22(5), 253–264. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2010.00060.x>
17. Barreiro, T., & Perillo, I. (2004). An Approach to Interpreting Spirometry. *American Family Physician*, 69(5), 1107–1114.
18. Batra, P. S., Tong, L., & Citardi, M. J. (2013). Analysis of comorbidities and objective parameters in refractory chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 123 Suppl 7, S1–11. <https://doi.org/10.1002/lary.24418>
19. Benninger, M. S., & Holy, C. E. (2014). The impact of endoscopic sinus surgery on health care use in patients with respiratory comorbidities. *Otolaryngology—Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, 151(3), 508–515. <https://doi.org/10.1177/0194599814536369>
20. Bębas, E., Borowska, M., Derlatka, M., Oczeretko, E., Hładuński, M., Szumowski, P., & Mojsak, M. (2021). Machine-learning-based classification of the histological subtype of non-small-cell lung cancer using MRI texture analysis. *Biomedical Signal Processing and Control*, 66, 102446. <https://doi.org/10.1016/j.bspc.2021.102446>
21. Bębas, E., Pauk, K., Pauk, J., Daunoravičienė, K., Mojsak, M., Hładuński, M., Domino, M., & Borowska, M. (2025). Application of Fractal Radiomics and Machine Learning for Differentiation of Non-Small Cell Lung Cancer Subtypes on PET/MR Images. *Journal of Clinical Medicine*, 14(16), 5776. <https://doi.org/10.3390/jcm14165776>
22. Bizzotto, D., Paganini, S., Stucchi, L., Avallone, M. P., Ramirez, E. M., Pompilio, P. P., Ferrucci, F., Lavoie, J.-P., & Dellacà, R. L. (2022). A portable fan-based device for evaluating lung function in horses by the forced oscillation technique. *Physiological Measurement*, 43(2), 025001. <https://doi.org/10.1088/1361-6579/ac522e>
23. Blakeslee Jr., J. R., Olsen, R. G., McAllister, E. S., Fassbender, J., & Dennis, R. (1975). Evidence of respiratory tract infection induced by equine herpesvirus, type 2, in the horse. *Canadian Journal of Microbiology*, 21(12), 1940–1946. <https://doi.org/10.1139/m75-281>

24. Bond, S. L., Timsit, E., Workentine, M., Alexander, T., & Léguillette, R. (2017). Upper and lower respiratory tract microbiota in horses: Bacterial communities associated with health and mild asthma (inflammatory airway disease) and effects of dexamethasone. *BMC Microbiology*, 17, 184. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1092-5>
25. Borowska, M. (2023). *Wprowadzenie do zastosowania entropii w analizie sygnałów i obrazów biomedycznych oraz jej aplikacje w medycynie i weterynarii*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej. <https://pbc.biaman.pl/dlibra/publication/70397/edition/68434>
26. Borowska, M., Lipowicz, P., Daunoravičienė, K., Turek, B., Jasiński, T., Pauk, J., & Domino, M. (2024). Three-Dimensional Segmentation of Equine Paranasal Sinuses in Multidetector Computed Tomography Datasets: Preliminary Morphometric Assessment Assisted with Clustering Analysis. *Sensors*, 24(11), 3538. <https://doi.org/10.3390/s24113538>
27. Bousquet, J., Khaltaev, N., Cruz, A. A., Denburg, J., Fokkens, W. J., Togias, A., Zuberbier, T., Baena-Cagnani, C. E., Canonica, G. W., van Weel, C., Agache, I., Ait-Khaled, N., Bachert, C., Blaiss, M. S., Bonini, S., Boulet, L.-P., Bousquet, P.-J., Camargos, P., Carlsen, K.-H., ... AllerGen. (2008). Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*, 63 Suppl 86, 8–160. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2007.01620.x>
28. Breiman, L. (2001). Random Forests. *Machine Learning*, 45(1), 5–32. <https://doi.org/10.1023/A:1010933404324>
29. Bresciani, M., Paradis, L., Des Roches, A., Vernhet, H., Vachier, I., Godard, P., Bousquet, J., & Chanez, P. (2001). Rhinosinusitis in severe asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(1), 73–80. <https://doi.org/10.1067/mai.2001.111593>
30. Bronco, A., Grassi, A., Meroni, V., Giovannoni, C., Rabboni, F., Rezoagli, E., Teggia-Droghi, M., Foti, G., & Bellani, G. (2021). Clinical value of electrical impedance tomography (EIT) in the management of patients with acute respiratory failure: A single centre experience. *Physiological Measurement*, 42(7). <https://doi.org/10.1088/1361-6579/ac0e85>
31. Brown, B. H. (2003). Electrical impedance tomography (EIT): A review. *Journal of Medical Engineering & Technology*, 27(3), 97–108. <https://doi.org/10.1080/0309190021000059687>
32. Bullone, M., & Lavoie, J.-P. (2020). The equine asthma model of airway remodeling: From a veterinary to a human perspective. *Cell and Tissue Research*, 380(2), 223–236. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03117-4>
33. Burnheim, K., Hughes, K. J., Evans, D. L., & Raidal, S. L. (2016). Reliability of breath by breath spirometry and relative flow-time indices for pulmonary function testing in horses. *BMC Veterinary Research*, 12, 268. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0893-3>
34. Butler, P. J., Woakes, A. J., Smale, K., Roberts, C. A., Hillidge, C. J., Snow, D. H., & Marlin, D. J. (1993). Respiratory and cardiovascular adjustments during exercise of increasing intensity and during recovery in thoroughbred racehorses. *The Journal of Experimental Biology*, 179, 159–180.

35. Cardwell, J. M., Smith, K. C., Wood, J. L. N., & Newton, J. R. (2014). Infectious risk factors and clinical indicators for tracheal mucus in British National Hunt racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 46(2), 150–155. <https://doi.org/10.1111/evj.12109>
36. Charles W Raker & Boles C L. (1978). *Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in the Horse*. 2, 202–207.
37. Cheetham, J., Pigott, J. H., Hermanson, J. W., Campoy, L., Soderholm, L. V., Thorson, L. M., & Ducharme, N. G. (2009). Role of the hypoglossal nerve in equine nasopharyngeal stability. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 107(2), 471–477. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91177.2008>
38. Cheng, D., Liu, M., Fu, J., & Wang, Y. (2017). *Classification of MR brain images by combination of multi-CNNs for AD diagnosis*. 10420, 1042042. <https://doi.org/10.1117/12.2281808>
39. Christley, R. M., Hodgson, D. R., Rose, R. J., Hodgson, J. L., Wood, J. L. N., & Reid, S. W. J. (2001). Coughing in thoroughbred racehorses: Risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Veterinary Record*, 148(4), 99–104. <https://doi.org/10.1136/vr.148.4.99>
40. Cilliers, I., Williams, J., Carstens, A., & Duncan, N. M. (2008). Three cases of osteoma and an osseous fibroma of the paranasal sinuses of horses in South Africa: Clinical communication. *Journal of the South African Veterinary Association*, 79(4), 185–193. <https://doi.org/10.4102/jsava.v79i4.271>
41. Cissell, D. D., Wisner, E. R., Textor, J., Mohr, F. C., Scrivani, P. V., & Théon, A. P. (2012). Computed Tomographic Appearance of Equine Sinonasal Neoplasia. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 53(3), 245–251. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2011.01913.x>
42. Clarke, A. F., Madelin, T. M., & Allpress, R. G. (1987). The relationship of air hygiene in stables to lower airway disease and pharyngeal lymphoid hyperplasia in two groups of Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 19(6), 524–530. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1987.tb02665.x>
43. Connally, B. A., & Derksen, F. J. (1994). Tidal breathing flow–volume loop analysis as a test of pulmonary function in exercising horses. *American Journal of Veterinary Research*, 55(5), 589–594.
44. Cook, W. R. (1974). Some observations on diseases of the ear, nose and throat in the horse, and endoscopy using a flexible fiberoptic endoscope. *The Veterinary Record*, 94(23), 533–541. <https://doi.org/10.1136/vr.94.23.533>
45. Cook, W. R. (2014). A hypothetical, aetiological relationship between the horse's bit, nasopharyngeal asphyxia and negative pressure pulmonary oedema: The horse's bit and negative pressure pulmonary oedema. *Equine Veterinary Education*, 26(7), 381–389. <https://doi.org/10.1111/eve.12196>
46. Cook, W. R., Williams, R. M., Kirker–Head, C. A., & Verbridge, D. J. (1988). Upper airway obstruction (partial asphyxia) as the possible cause of exercise–induced pulmonary hemorrhage in the horse: An hypothesis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 8(1), 11–26. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(88\)80103-5](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(88)80103-5)
47. Couetil, L., Cardwell, J. M., Leguillette, R., Mazan, M., Richard, E., Bienzle, D., Bullone, M., Gerber, V., Ivester, K., Lavoie, J.–P., Martin, J., Moran, G., Niedźwiedź,

- A., Pusterla, N., & Swiderski, C. (2020). Equine Asthma: Current Understanding and Future Directions. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 450. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00450>
48. Couëtil, L. I., Cardwell, J. M., Gerber, V., Lavoie, J.-P., Léguillette, R., & Richard, E. A. (2016). Inflammatory Airway Disease of Horses—Revised Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(2), 503–515. <https://doi.org/10.1111/jvim.13824>
49. Couetil, L. L., Rosenthal, F. S., DeNicola, D. B., & Chilcoat, C. D. (2001a). Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *American Journal of Veterinary Research*, 62(4), 538–546. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.538>
50. Couetil, L. L., Rosenthal, F. S., DeNicola, D. B., & Chilcoat, C. D. (2001b). Clinical signs, evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and assessment of pulmonary function in horses with inflammatory respiratory disease. *American Journal of Veterinary Research*, 62(4), 538–546. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.538>
51. Couroucé, A., Geffroy, O., Barrey, E., Auvinet, B., & Rose, R. J. (1999). Comparison of exercise tests in French trotters under training track, racetrack and treadmill conditions. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, 30, 528–532. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1999.tb05278.x>
52. Couroucé-Malblanc, A., Deniau, V., Rossignol, F., Corde, R., Leleu, C., Maillard, K., PiTEL, P.-H., Pronost, S., & Fortier, G. (2010). Physiological measurements and prevalence of lower airway diseases in Trotters with dorsal displacement of the soft palate. *Equine Veterinary Journal*, 42(s38), 246–255. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00276.x>
53. Crijns, C. P., Baeumlin, Y., De Rycke, L., Broeckx, B. J. G., Vlaminck, L., Bergman, E. H. J., van Bree, H., & Gielen, I. (2016). Intra-arterial versus intra venous contrast-enhanced computed tomography of the equine head. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 6. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0632-9>
54. Davidson, E. J., Harris, M., Martin, B. B., Nolen-Walston, R., Boston, R. C., & Reef, V. (2011). Exercising Blood Gas Analysis, Dynamic Upper Respiratory Tract Obstruction, and Postexercising Bronchoalveolar Lavage Cytology—A Comparative Study in Poor Performing Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(8), 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2011.03.003>
55. Davis, K. U., & Sheats, M. K. (2019). Bronchoalveolar Lavage Cytology Characteristics and Seasonal Changes in a Herd of Pastured Teaching Horses. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 74. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00074>
56. De Zani, D., Zani, D. D., Borgonovo, S., Di Giancamillo, M., Rondena, M., & Verschooten, F. (2011). An undifferentiated sarcoma in the cervical region in a horse: Undifferentiated cervical sarcoma in a horse. *Equine Veterinary Education*, 23(3), 138–141. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2010.00202.x>
57. Desiraju, K., & Agrawal, A. (2016). Impulse oscillometry: The state-of-art for lung function testing. *Lung India : Official Organ of Indian Chest Society*, 33(4), 410–416. <https://doi.org/10.4103/0970-2113.184875>
58. Dixon, P. M., Kennedy, R., Poll, K., Barakzai, S., & Reardon, R. J. M. (2021). A long-term study of sinusoscopic treatment of equine paranasal sinus disease: 155 cases

- (2012–2019). *Equine Veterinary Journal*, 53(5), 979–989. <https://doi.org/10.1111/evj.13393>
59. Dobrin, A. (2005). *A review of properties and variations of Voronoi diagrams*. Whitman College: Walla Walla, WA, USA, pp. 1–43.
  60. Domino, M., Borowska, M., Kozłowska, N., Trojakowska, A., Zdrojkowski, Ł., Jasiński, T., Smyth, G., & Maśko, M. (2022). Selection of Image Texture Analysis and Color Model in the Advanced Image Processing of Thermal Images of Horses following Exercise. *Animals*, 12(4), 444. <https://doi.org/10.3390/ani12040444>
  61. Ducharme, N. G., Hackett, R. P., Woodie, J. B., Dykes, N., Erb, H. N., Mitchell, L. M., & Soderholm, L. V. (2003). Investigations into the role of the thyrohyoid muscles in the pathogenesis of dorsal displacement of the soft palate in horses. *Equine Veterinary Journal*, 35(3), 258–263. <https://doi.org/10.2746/042516403776148200>
  62. Dunkel, B., Gibbs, C., & Weller, R. (2013). A fresh approach to equine thoracic radiography. *In Practice*, 35(10), 589–596. <https://doi.org/10.1136/inp.f5977>
  63. Erck, E., Votion, D., Art, T., & Lekeux, P. (2010). Measurement of respiratory function by impulse oscillometry in horses. *Equine Veterinary Journal*, 36(1), 21–28. <https://doi.org/10.2746/0425164044864714>
  64. Erck, E. van, Votion, D. M., Kirschvink, N., Art, T., & Lekeux, P. (2003). Use of the impulse oscillometry system for testing pulmonary function during methacholine bronchoprovocation in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 64(11), 1414–1420. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.1414>
  65. Evans, D. L., Kiddell, L., & Smith, C. L. (2011). Pulmonary function measurements immediately after exercise are correlated with neutrophil percentage in tracheal aspirates in horses with poor racing performance. *Research in Veterinary Science*, 90(3), 510–515. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.003>
  66. Fenner, M. F., Verwilghen, D., Townsend, N., Simhofer, H., Schwarzer, J., Zani, D. D., & Bienert–Zeit, A. (2019). Paranasal sinus cysts in the horse: Complications related to their presence and surgical treatment in 37 cases. *Equine Veterinary Journal*, 51(1), 57–63. <https://doi.org/10.1111/evj.12959>
  67. Ferrell, E. A., Gavin, P. R., Tucker, R. L., Sellon, D. C., & Hikes, Melissa T. (2002). mMgnetic resonance for evaluation of neurologic disease in 12 horses. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 43(6), 510–516. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2002.tb01041.x>
  68. Fitz, J., & Gerhards, H. (2005). Magnetic resonance imaging of the thorax and abdomen in foals. *Pferdeheilkunde*, 21, 115–123. <https://doi.org/10.21836/PEM20050202>
  69. Fokkens, W., Lund, V., Mullol, J., & European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps group. (2007). European position paper on rhinosinusitis and nasal polyps 2007. *Rhinology. Supplement*, 20, 1–136.
  70. Fortier, G., Richard, E., Hue, E., Fortier, C., Pronost, S., Pottier, D., Lemaitre, L., Lekeux, P., Borchers, K., & Thiry, E. (2013). Long-lasting airway inflammation associated with equid herpesvirus–2 in experimentally challenged horses. *The Veterinary Journal*, 197(2), 492–495. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.12.027>
  71. Fraipont, A., Van Erck, E., Ramery, E., Richard, E., Denoix, J.–M., Lekeux, P., & Art, T. (2011). Subclinical diseases underlying poor performance in endurance

horses: Diagnostic methods and predictive tests. *The Veterinary Record*, 169(6), 154. <https://doi.org/10.1136/vr.d4142>

72. Freeman, D. E. (2015). Update on disorders and treatment of the guttural pouch. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 31(1), 63–89. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.11.010>

73. Fripiat, T., van den Wollenberg, L., van Erck–Westergren, E., van Maanen, K., & Votion, D.–M. (2025). Respiratory viruses affecting health and performance in equine athletes. *Virology*, 603, 110372. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110372>

74. Gajarlwar, O. S., Suryawanshi, R. V., Ulemale, A. H., Rangnekar, M. N., & Khambatta, P. (2020). Prevalence of upper respiratory tract affections in thoroughbred horses through resting endoscopy. *Haryana Veterinarian*, 59, 14–19.

75. Garrett, K. S. (2012). Advances in diagnostic imaging of the larynx and pharynx. *Equine Veterinary Education*, 24(1), 17–18. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2011.00269.x>

76. Garrett, K. S., Woodie, J. B., Cook, J. L., & Williams, N. M. (2010). Imaging diagnosis–Nasal septal and laryngeal cyst–like malformations in a Thoroughbred weanling colt diagnosed using ultrasonography and magnetic resonance imaging. *Veterinary Radiology & Ultrasound: The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 51(5), 504–507. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2010.01703.x>

77. Garrett, K. S., Woodie, J. B., Embertson, R. M., & Pease, A. P. (2009). Diagnosis of laryngeal dysplasia in five horses using magnetic resonance imaging and ultrasonography. *Equine Veterinary Journal*, 41(8), 766–771. <https://doi.org/10.2746/042516409X434080>

78. Gaur, P., Gupta, H., Chowdhury, A., Mc Creadie, K., Pachori, R. B., & Wang, H. (2021). A Sliding Window Common Spatial Pattern for Enhancing Motor Imagery Classification in EEG–BCI. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement*, 70(4002709), 1–9. <https://doi.org/10.1109/TIM.2021.3051996>

79. Gehlen, H., Oey, L., Rohn, K., Bilzer, T., & Stadler, P. (2008). Pulmonary Dysfunction and Skeletal Muscle Changes in Horses with RAO. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(4), 1014–1021. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0111.x>

80. Gerber, V., Lindberg, Å., Berney, C., & Robinson, N. E. (2004). Airway Mucus in Recurrent Airway Obstruction– Short-Term Response to Environmental Challenge. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(1), 92–97. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2004.tb00140.x>

81. Gerber, V., Robinson, N. E., Luethi, S., Marti, E., Wampfler, B., & Straub, R. (2003). Airway inflammation and mucus in two age groups of asymptomatic well-performing sport horses. *Equine Veterinary Journal*, 35(5), 491–495. <https://doi.org/10.2746/042516403775600424>

82. Gerber, V., Straub, R., Marti, E., Hauptman, J., Herholz, C., King, M., Imhof, A., Tahon, L., & Robinson, N. E. (2004). Endoscopic scoring of mucus quantity and quality: Observer and horse variance and relationship to inflammation, mucus viscoelasticity and volume. *Equine Veterinary Journal*, 36(7), 576–582. <https://doi.org/10.2746/0425164044864525>



83. Giovannini-Chami, L., Paquet, A., Sanfiorenzo, C., Pons, N., Cazareth, J., Magnone, V., Lebrigand, K., Chevalier, B., Vallauri, A., Julia, V., Marquette, C.-H., Marcet, B., Leroy, S., & Barbry, P. (2018). The “one airway, one disease” concept in light of Th2 inflammation. *European Respiratory Journal*, 52(4). <https://doi.org/10.1183/13993003.00437-2018>
84. Gosker, H. R., van Mameren, H., van Dijk, P. J., Engelen, M. P. K. J., van der Vusse, G. J., Wouters, E. F. M., & Schols, A. M. W. J. (2002). Skeletal muscle fibre-type shifting and metabolic profile in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *The European Respiratory Journal*, 19(4), 617–625. <https://doi.org/10.1183/09031936.02.00762001>
85. Górski, K., Borowska, M., Stefanik, E., Polkowska, I., Turek, B., Bereznowski, A., & Domino, M. (2022). Selection of Filtering and Image Texture Analysis in the Radiographic Images Processing of Horses’ Incisor Teeth Affected by the EOTRH Syndrome. *Sensors*, 22(8), 2920. <https://doi.org/10.3390/s22082920>
86. Grossman, J. (1997). One airway, one disease. *Chest*, 111(2 Suppl), 11S–16S. [https://doi.org/10.1378/chest.111.2\\_supplement.11s](https://doi.org/10.1378/chest.111.2_supplement.11s)
87. Guo, L., Yu, X., Thair, A., Rideout, A., Collins, A., Wang, Z. J., & Hore, M. (2024). Deep learning model shows promise for detecting and grading sesamoiditis in horse radiographs. *American Journal of Veterinary Research*, 85(1), ajvr.23.07.0173. <https://doi.org/10.2460/ajvr.23.07.0173>
88. Guthrie, A. J., Beadle, R. E., Bateman, R. D., & White, C. E. (1995). Characterization of normal tidal breathing flow–volume loops for Thoroughbred horses. *Veterinary Research Communications*, 19(4), 331–342. <https://doi.org/10.1007/BF01839315>
89. Gutierrez–Nibeyro, S. D., Werpy, N. M., Gold, S. J., Olguin, S., & Schaeffer, D. J. (2020). Standing MRI lesions of the distal interphalangeal joint and podotrochlear apparatus occur with a high frequency in warmblood horses. *Veterinary Radiology & Ultrasound: The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association*, 61(3), 336–345. <https://doi.org/10.1111/vru.12855>
90. Håkansson, K., Thomsen, S. F., Konge, L., Mortensen, J., Backer, V., & von Buchwald, C. (2014). A comparative and descriptive study of asthma in chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *American Journal of Rhinology & Allergy*, 28(5), 383–387. <https://doi.org/10.2500/ajra.2014.28.4076>
91. Hansen, S., Honoré, M. L., Riihimäki, M., Pringle, J., Ammentorp, A. H., & Fjeldborg, J. (2018). Seasonal Variation in Tracheal Mucous and Bronchoalveolar Lavage Cytology for Adult Clinically Healthy Stabled Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 71, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.09.001>
92. Hathcock, J. T., & Stickle, R. L. (1993). Principles and Concepts of Computed Tomography. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 23(2), 399–415. [https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(93\)50034-7](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(93)50034-7)
93. Henninger, W., Mairi Frame, E., Willmann, M., Simhofer, H., Malleczek, D., Kneissl, S. M., & Mayrhofer, E. (2003). CT features of alveolitis and sinusitis in horses. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 44(3), 269–276. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2003.tb00454.x>

94. Herholz, C., Straub, R., Braendlin, C., Imhof, A., Lüthi, S., & Busato, A. (2003). Measurement of tidal breathing flow–volume loop indices in horses used for different sporting purposes with and without recurrent airway obstruction. *Veterinary Record*, 152(10), 288–292. <https://doi.org/10.1136/vr.152.10.288>
95. Herteman, N., Mosing, M., Waldmann, A., Gerber, V., & Schoster, A. (2021). Exercise–induced airflow changes in horses with asthma measured by electrical impedance tomography. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35. <https://doi.org/10.1111/jvim.16260>
96. Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., & Geor, R. J. (2008). *Equine Exercise Physiology: The Science of Exercise in the Athletic Horse*. Elsevier Health Sciences.
97. Hobo, S., Matsuda, Y., & Yoshida, K. (1995). Prevalence of upper respiratory tract disorders detected with a flexible videoendoscope in thoroughbred racehorses. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 57(3), 409–413. <https://doi.org/10.1292/jvms.57.409>
98. Hoffman, A. M. (2008). Bronchoalveolar Lavage: Sampling Technique and Guidelines for Cytologic Preparation and Interpretation. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24(2), 423–435. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2008.04.003>
99. Holcombe, S., & Ducharme, N. (2007). Disorders of the Nasopharynx and Soft Palate. W *Equine Respiratory Medicine and Surgery* (s. 437–457). <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2759-8.50034-9>
100. Holcombe, S. J., Derksen, F. J., Berney, C., Becker, A. C., & Horner, N. T. (2001). Effect of topical anesthesia of the laryngeal mucosa on upper airway mechanics in exercising horses. *American Journal of Veterinary Research*, 62(11), 1706–1710. <https://doi.org/10.2460/ajvr.2001.62.1706>
101. Holcombe, S. J., Derksen, F. J., Stick, J. A., & Robinson, N. E. (1998). Effect of bilateral blockade of the pharyngeal branch of the vagus nerve on soft palate function in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 59(4), 504–508.
102. Holcombe, S. J., Derksen, F. J., Stick, J. A., & Robinson, N. E. (2010). Pathophysiology of dorsal displacement of the soft palate in horses. *Equine Veterinary Journal*, 31(S30), 45–48. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1999.tb05186.x>
103. Holcombe, S. J., Robinson, N. E., Derksen, F. J., Bertold, B., Genovese, R., Miller, R., de Feiter Rupp, H., Carr, E. A., Eberhart, S. W., Boruta, D., & Kaneene, J. B. (2006). Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 38(4), 300–304. <https://doi.org/10.2746/042516406777749191>
104. Huang, G., GuoHeng, G., & LiangLun, L. (2018). Medical Image Segmentation of Blood Vessels Based on Clifford Algebra and Voronoi Diagram. *Journal of Software*, 13, 360–373. <https://doi.org/10.17706/jsw.13.6.360-373>
105. Hunter, R. S. (1958). Photoelectric Color Difference Meter. *Journal of the Optical Society of America* (1917–1983), 48, 985. <https://doi.org/10.1364/JOSA.48.000985>
106. Hyatt, R. E., Scanlon, P. D., & Nakamura (Pulmonologist), M. (2014). *Interpretation of Pulmonary Function Tests*. Lippincott Williams & Wilkins.
107. Intemann, S., Reckels, B., Schubert, D. C., Wolf, P., Kamphues, J., & Visscher, C. (2022). The Microbiological Quality of Concentrates for Horses–A Retrospective

Study on Influencing Factors and Associations with Clinical Symptoms Reported by Owners or Referring Vets. *Veterinary Sciences*, 9(8), 413. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080413>

108. Ivester, K. M., Couëtil, L. L., & Moore, G. E. (2018). An observational study of environmental exposures, airway cytology, and performance in racing thoroughbreds. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(5), 1754–1762. <https://doi.org/10.1111/jvim.15226>

109. Jasti, V. D. P., Zamani, A. S., Arumugam, K., Naved, M., Pallathadka, H., Sammy, F., Raghuvanshi, A., & Kaliyaperumal, K. (2022). Computational Technique Based on Machine Learning and Image Processing for Medical Image Analysis of Breast Cancer Diagnosis. *Security and Communication Networks*, 2022, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2022/1918379>

110. Joó, K., Povázsai, Á., Nyerges–Bohák, Z., Szenci, O., & Kutasi, O. (2021). Asthmatic Disease as an Underlying Cause of Dorsal Displacement of the Soft Palate in Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 96, 103308. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103308>

111. Kaiseler, P. H., Dzyekanski, B., Schiefelbein, R., Silveira, R. G., Pimpão, C. T., & Michelotto Jr, P. V. (2012). Upper airway evaluations of thoroughbred racehorses in a private clinic in Curitiba, Brazil—Resitng endoscopic findings in 587 horses. *Archives of Veterinary Science*, 17(4). <https://doi.org/10.5380/avs.v17i4.22645>

112. Kannegieter, N. J., & Dore, M. L. (1995). Endoscopy of the upper respiratory tract during treadmill exercise: A clinical study of 100 horses. *Australian Veterinary Journal*, 72(3), 101–107. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1995.tb15020.x>

113. Kebir, S., Weber, M., Lazaridis, L., Deuschl, C., Schmidt, T., Mönninghoff, C., Keyvani, K., Umutlu, L., Pierscianek, D., Forsting, M., Sure, U., Stuschke, M., Kleinschnitz, C., Scheffler, B., Colletti, P. M., Rubello, D., Rischpler, C., & Glas, M. (2019). Hybrid 11C–MET PET/MRI Combined With „Machine Learning” in Glioma Diagnosis According to the Revised Glioma WHO Classification 2016. *Clinical Nuclear Medicine*, 44(3), 214–220. <https://doi.org/10.1097/RLU.0000000000002398>

114. Koblinger, K., Nicol, J., McDonald, K., Wasko, A., Logie, N., Weiss, M., & Léguillette, R. (2011). Endoscopic Assessment of Airway Inflammation in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(5), 1118–1126. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00788.x>

115. Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2022). Advances in the diagnosis of equine respiratory diseases: a review of novel imaging and functional techniques. *Animals*, 12(3), 381. <https://doi.org/10.3390/ani12030381>

116. Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Pawliński, B., & Domino, M. (2023). Co–Occurrence of Severe Equine Asthma and Palatal Disorders in Privately Owned Pleasure Horses. *Animals*, 13(12), 1962. <https://doi.org/10.3390/ani13121962>

117. Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2024). Co–Occurrence of Equine Asthma and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Pleasure Horses. *Agriculture*, 14(7), 1157. <https://doi.org/10.3390/agriculture14071157>

118. Kozłowska, N., Borowska M., Jasiński, T., Wierzbicka, M., & Domino, M. (2025). Computer–aided diagnosis of equine pharyngeal lymphoid hyperplasia using the

- object detection-based processing technique of digital endoscopic images. *Animals* 15(18): 2758. <https://doi.org/10.3390/ani15182758>
119. Lane, J. G., Bladon, B., Little, D. R. M., Naylor, J. R. J., & Franklin, S. H. (2010). Dynamic obstructions of the equine upper respiratory tract. Part 1: Observations during high-speed treadmill endoscopy of 600 Thoroughbred racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 38(5), 393–399. <https://doi.org/10.2746/042516406778400583>
  120. Lau, C., Kalantari, B., Batts, K. P., Ferrell, L. D., Nyberg, S. L., Graham, R. P., & Moreira, R. K. (2021). The Voronoi theory of the normal liver lobular architecture and its applicability in hepatic zonation. *Scientific Reports*, 11(1), 9343. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88699-2>
  121. Lavoie, J. P., Bullone, M., Rodrigues, N., Germim, P., Albrecht, B., & Von Salis-Soglio, M. (2019). Effect of different doses of inhaled ciclesonide on lung function, clinical signs related to airflow limitation and serum cortisol levels in horses with experimentally induced mild to severe airway obstruction. *Equine Veterinary Journal*, 51(6), 779–786. <https://doi.org/10.1111/evj.13093>
  122. Lee, G. K. C., Beeler-Marfisi, J., Viel, L., Piché, É., Kang, H., Sears, W., & Bienzle, D. (2022). Bronchial brush cytology, endobronchial biopsy, and SALSA immunohistochemistry in severe equine asthma. *Veterinary Pathology*, 59(1), 100–111. <https://doi.org/10.1177/03009858211048635>
  123. Leith, D. E. (1976). Comparative mammalian respiratory mechanics. *The Physiologist*, 19(4), 485–510.
  124. Li, B., & Meng, M. Q.-H. (2012). Tumor recognition in wireless capsule endoscopy images using textural features and SVM-based feature selection. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine: A Publication of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, 16(3), 323–329. <https://doi.org/10.1109/TITB.2012.2185807>
  125. Lin, W., Gao, Q., Du, M., Chen, W., & Tong, T. (2021). Multiclass diagnosis of stages of Alzheimer's disease using linear discriminant analysis scoring for multimodal data. *Computers in Biology and Medicine*, 134, 104478. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104478>
  126. Lo Feudo, C. M., Stancari, G., Collavo, F., Stucchi, L., Conturba, B., Zucca, E., & Ferrucci, F. (2022). Upper and Lower Airways Evaluation and Its Relationship with Dynamic Upper Airway Obstruction in Racehorses. *Animals*, 12(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ani12121563>
  127. Lo Feudo, C. M., Stucchi, L., Alberti, E., Stancari, G., Conturba, B., Zucca, E., & Ferrucci, F. (2021). The Role of Thoracic Ultrasonography and Airway Endoscopy in the Diagnosis of Equine Asthma and Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage. *Veterinary Sciences*, 8(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/vetsci8110276>
  128. Lymperopoulos, G., Lymperopoulos, P., Alikari, V., Dafogianni, C., Zyga, S., & Margari, N. (2017). Applications for Electrical Impedance Tomography (EIT) and Electrical Properties of the Human Body. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 989, 109–117. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-57348-9\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-57348-9_9)
  129. Madama, D., Silva, A., & Matos, M. J. (2016). Overlap syndrome–Asthma and obstructive sleep apnea. *Revista Portuguesa De Pneumologia*, 22(1), 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2015.08.005>

130. Manso-Díaz, G., García-López, J. M., Maranda, L., & Taeymans, O. (2015). The role of head computed tomography in equine practice. *Equine Veterinary Education*, 27(3), 136–145. <https://doi.org/10.1111/eve.12275>
131. Marr, C. (1993). Thoracic ultrasonography. *Equine Veterinary Education*, 5(1), 41–46. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.1993.tb00990.x>
132. McKane, S. A., & Slocombe, R. F. (2010). Experimental mild pulmonary inflammation promotes the development of exercise-induced pulmonary haemorrhage. *Equine Veterinary Journal. Supplement*, 38, 235–239. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00295.x>
133. Moens, Y. P. S. (2010). Clinical application of continuous spirometry with a pitot-based flow meter during equine anaesthesia. *Equine Veterinary Education*, 22(7), 354–360. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2010.00066.x>
134. Moens, Y., Schramel, J., Tusman, Ambrisko, T., Solà, J., Brunner, J., Kowalczyk, & Böhm. (2013). Variety of non-invasive continuous monitoring methodologies including electrical impedance tomography provides novel insights into the physiology of lung collapse and recruitment – case report of an anaesthetized horse. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 41. <https://doi.org/10.1111/vaa.12098>
135. Morresey, P. R. (2014). Ultrasonography of the Pleural Cavity, Lung, and Diaphragm. W *Atlas of Equine Ultrasonography* (s. 365–378). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118798119.ch21>
136. Mosing, M., Marly-Voquer, C., Macfarlane, P., Bardell, D., Bohm, S., Bettschart-Wolfensberger, R., & Waldmann, A. (2016). Regional distribution of ventilation in horses in dorsal recumbency during spontaneous and mechanical ventilation assessed by electrical impedance tomography: A case series. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 44. <https://doi.org/10.1111/vaa.12405>
137. Mosing, M., Waldmann, A., Macfarlane, P., Iff, S., Auer, U., Bohm, S., Bettschart-Wolfensberger, R., & Bardell, D. (2016). Horses Auto-Recruit Their Lungs by Inspiratory Breath Holding Following Recovery from General Anaesthesia. *PloS one*, 11, e0158080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158080>
138. Mukhtorov, D., Rakhmonova, M., Muksimova, S., & Cho, Y.-I. (2023). Endoscopic Image Classification Based on Explainable Deep Learning. *Sensors*, 23(6), 3176. <https://doi.org/10.3390/s23063176>
139. Newman, K. B., Mason, U. G., & Schmalting, K. B. (1995). Clinical features of vocal cord dysfunction. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 152(4 Pt 1), 1382–1386. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.152.4.7551399>
140. Ostrowska, J., Lindström, L., Tóth, T., Hansson, K., Uhlhorn, M., & Ley, C. J. (2020). Computed tomography characteristics of equine paranasal sinus cysts. *Equine Veterinary Journal*, 52(4), 538–546. <https://doi.org/10.1111/evj.13212>
141. Ozsahin, I., Sekeroglu, B., Musa, M. S., Mustapha, M. T., & Uzun Ozsahin, D. (2020). Review on Diagnosis of COVID-19 from Chest CT Images Using Artificial Intelligence. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2020(1), 9756518. <https://doi.org/10.1155/2020/9756518>
142. Paillot, R. (2014). A Systematic Review of Recent Advances in Equine Influenza Vaccination. *Vaccines*, 2(4), 797–831. <https://doi.org/10.3390/vaccines2040797>

143. Parsons, J. P., Benninger, C., Hawley, M. P., Philips, G., Forrest, L. A., & Mastronarde, J. G. (2010). Vocal cord dysfunction: Beyond severe asthma. *Respiratory Medicine*, 104(4), 504–509. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.11.004>
144. Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., Blondel, M., Prettenhofer, P., Weiss, R., Dubourg, V., Vanderplas, J., Passos, A., & Cournapeau, D. (2011). Scikit-learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*, 12, 2825–2830.
145. Petsche, V. M., Derksen, F. J., & Robinson, N. E. (1994). Tidal breathing flow–volume loops in horses with recurrent airway obstruction (heaves). *American Journal of Veterinary Research*, 55(7), 885–891.
146. Phipps, R. J., & Richardson, P. S. (1976). The effects of irritation at various levels of the airway upon tracheal mucus secretion in the cat. *The Journal of Physiology*, 261(3). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1976.sp011574>
147. Pusterla, N., & Hussey, G. S. (2014). Equine herpesvirus 1 myeloencephalopathy. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 30(3), 489–506. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.006>
148. Ragab, M., Albukhari, A., Alyami, J., & Mansour, R. F. (2022). Ensemble Deep–Learning–Enabled Clinical Decision Support System for Breast Cancer Diagnosis and Classification on Ultrasound Images. *Biology*, 11(3), 439. <https://doi.org/10.3390/biology11030439>
149. Raidal, S. L., Burnheim, K., Evans, D., & Hughes, K. J. (2017). Effects of sedation and salbutamol administration on hyperpnoea and tidal breathing spirometry in healthy horses. *The Veterinary Journal*, 222, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.03.001>
150. Rezaei, Z. (2021). A review on image–based approaches for breast cancer detection, segmentation, and classification. *Expert Systems With Applications*, 182(C). <https://doi.org/10.1016/j.eswa.2021.115204>
151. Richard, E. A., Fortier, G. D., Denoix, J.–M., Art, T., Lekeux, P. M., & Erck, E. van. (2009). Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function evaluated by impulse oscillometry. *Equine Veterinary Journal*, 41(4), 384–389. <https://doi.org/10.2746/042516409X366121>
152. Richard, E. A., Fortier, G. D., Lekeux, P. M., & Van Erck, E. (2010). Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly–performing horse. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 185(2), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.05.003>
153. Robinson, N. E., Berney, C., Behan, A., & Derksen, F. J. (2009). Fluticasone propionate aerosol is more effective for prevention than treatment of recurrent airway obstruction. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.1111/j.1939–1676.2009.0382.x>
154. Robinson, N. E., Karmaus, W., Holcombe, S. J., Carr, E. A., & Derksen, F. J. (2006). Airway inflammation in Michigan pleasure horses: Prevalence and risk factors. *Equine Veterinary Journal*, 38(4), 293–299. <https://doi.org/10.2746/04251640677749281>
155. Rothe, T., & Karrer, W. (1998). Functional upper airway obstruction and chronic irritation of the larynx. *European Respiratory Journal*, 11(2), 498–500. <https://doi.org/10.1183/09031936.98.11020498>

156. Roy, M.-F., & Lavoie, J.-P. (2002). Diagnosis and management of pulmonary abscesses in the horse. *Equine Veterinary Education*, 14(6), 322–327. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2002.tb00198.x>
157. Rush, B., & Mair, T. (2008). *Equine Respiratory Diseases*. John Wiley & Sons.
158. Sacks, M., Byrne, D. P., Herteman, N., Secombe, C., Adler, A., Hosgood, G., Raisis, A. L., & Mosing, M. (2021). Electrical impedance tomography to measure lung ventilation distribution in healthy horses and horses with left-sided cardiac volume overload. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(5), 2511–2523. <https://doi.org/10.1111/jvim.16227>
159. Saulez, M. N., & Gummow, B. (2009). Prevalence of pharyngeal, laryngeal and tracheal disorders in thoroughbred racehorses, and effect on performance. *Veterinary Record*, 165(15), 431–435. <https://doi.org/10.1136/vr.165.15.431>
160. Schliewert, E.-C., Lascola, K. M., O'Brien, R. T., Clark-Price, S. C., Wilkins, P. A., Foreman, J. H., Mitchell, M. A., Hartman, S. K., & Kline, K. H. (2015). Comparison of radiographic and computed tomographic images of the lungs in healthy neonatal foals. *American Journal of Veterinary Research*, 76(1), 42–52. <https://doi.org/10.2460/ajvr.76.1.42>
161. Schramel, J., Nagel, C., Auer, U., Palm, F., Aurich, C., & Moens, Y. (2011). Distribution of ventilation in pregnant Shetland ponies Shetland ponies measured by Electrical Impedance Tomography. *Respiratory physiology and neurobiology*, 180, 258–262. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2011.11.018>
162. Secombe, C., Waldmann, A., Hosgood, G., & Mosing, M. (2019). Evaluation of histamine-provoked changes in airflow using electrical impedance tomography in horses. *Equine Veterinary Journal*, 52. <https://doi.org/10.1111/evj.13216>
163. Settipane, R. J., Hagy, G. W., & Settipane, G. A. (1994). Long-term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis: A 23-year follow-up study of college students. *Allergy Proceedings: The Official Journal of Regional and State Allergy Societies*, 15(1), 21–25. <https://doi.org/10.2500/108854194778816634>
164. Simões, J., & Tilley, P. (2023). Decision Making in Severe Equine Asthma–Diagnosis and Monitoring. *Animals*, 13(24), 3872. <https://doi.org/10.3390/ani13243872>
165. Sliwinski, H., Krabisch, P., Rosenberger, E., & Schwarz, F. J. (2005). Hygienic quality of different forages and concentrates for horses: *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 21(7), 26–26. <https://doi.org/10.21836/PEM20050709>
166. Solano, M., & Brawer, R. S. (2004). CT of the Equine Head: Technical Considerations, Anatomical Guide, and Selected Diseases. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 3(4), 374–388. <https://doi.org/10.1053/j.ctep.2005.02.016>
167. Soltész, L., Leyens, J., Vogel, M., Muders, T., Putensen, C., Kipfmüller, F., Dresbach, T., Mueller, A., & Schroeder, L. (2025). EIT guided evaluation of regional ventilation distributions in neonatal and pediatric ARDS: A prospective feasibility study. *Respiratory Research*, 26(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12931-025-03134-8>
168. Spoormakers, T. J. P., Ensink, J. M., Goehring, L. S., Koeman, J. P., Braake, F. T., Vlugt-Meijer, R. H. van der, & Belt, A. J. M. van der. (2010). Brain abscesses as a metastatic manifestation of strangles: Symptomatology and the use of magnetic resonance imaging as a diagnostic aid. *Equine Veterinary Journal*, 35(2), 146–151. <https://doi.org/10.2746/042516403776114153>

169. Strohmayer, C., Klang, A., & Kneissl, S. (2020). Computed Tomographic and Histopathological Characteristics of 13 Equine and 10 Feline Oral and Sinonasal Squamous Cell Carcinomas. *Frontiers in Veterinary Science*, 7. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fvets.2020.591437>
170. Stucchi, L., Ferrucci, F., Dellacà, R. L., Lafortuna, C. L., Bullone, M., Pompilio, P. P., Tabozzi, S., & Lavoie, J. P. (2018). *Within-breath input impedance by impulse oscillometry in severely asthmatic horses*. <https://air.unimi.it/handle/2434/599470>
171. Sudbø, J., Marcelpoil, R., & Reith, A. (2000). New algorithms based on the Voronoi Diagram applied in a pilot study on normal mucosa and carcinomas. *Analytical Cellular Pathology: The Journal of the European Society for Analytical Cellular Pathology*, 21(2), 71–86. <https://doi.org/10.1155/2000/389361>
172. Sullivan, E. K., & Parente, E. J. (2003). Disorders of the pharynx. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 19(1), 159–167. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(02\)00071-8](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(02)00071-8)
173. Sweeney, C. R., Maxson, A. D., & Soma, L. R. (1991). Endoscopic findings in the upper respiratory tract of 678 Thoroughbred racehorses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(6), 1037–1038.
174. Sweeney, C. R., Timoney, J. F., Newton, J. R., & Hines, M. T. (2005). Streptococcus equi infections in horses: Guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(1), 123–134.
175. Taillé, C., Rouvel-Talleg, A., Stoica, M., Danel, C., Dehoux, M., Marin-Esteban, V., Pretolani, M., Aubier, M., & d’Ortho, M.-P. (2016). Obstructive Sleep Apnoea Modulates Airway Inflammation and Remodelling in Severe Asthma. *Plos ONE*, 11(3), e0150042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150042>
176. Tessier, C. (2006). The equine nasopharynx in dynamic upper airway disorders: An update. *Pferdeheilkunde*, 22, 565–568. <https://doi.org/10.21836/PEM20060507>
177. Tessier, C., Brühshwein, A., Lang, J., Konar, M., Wilke, M., Brehm, W., & Kircher, P. (2013). Magnetic resonance imaging features of sinonasal disorders in horses. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 54(1), 54–60. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2012.01975.x>
178. Textor, J. A., Puchalski, S. M., Affolter, V. K., MacDonald, M. H., Galuppo, L. D., & Wisner, E. R. (2012). Results of computed tomography in horses with ethmoid hematoma: 16 cases (1993–2005). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(11), 1338–1344. <https://doi.org/10.2460/javma.240.11.1338>
179. Toutain, M., Lezoray, O., Audigié, F., Busoni, V., Rossi, G., Parillo, F., & Elmoataz, A. (2012). Analysis of whole slide images of equine tendinopathy. *ICIAR (International Conference on Image Analysis and Recognition)*, 7325, 440–447. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-31298-4\\_52](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31298-4_52)
180. Tremaine, W. H., & Dixon, P. M. (2001). A long-term study of 277 cases of equine sinonasal disease. Part 1: Details of horses, historical, clinical and ancillary diagnostic findings. *Equine Veterinary Journal*, 33(3), 274–282. <https://doi.org/10.2746/042516401776249615>
181. Tucker, R. L., & Farrell, E. (2001). Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging of the Equine Head. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 17(1), 131–144. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30079-2](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30079-2)



182. Turek, B., Pawlikowski, M., Jankowski, K., Borowska, M., Skierbiszewska, K., Jasiński, T., & Domino, M. (2025). Selection of density standard and X-ray tube settings for computed digital absorptiometry in horses using the k-means clustering algorithm. *BMC Veterinary Research*, 21(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s12917-025-04591-5>
183. Van Cleemput, J., Poelaert, K. C. K., Laval, K., Impens, F., Van den Broeck, W., Gevaert, K., & Nauwynck, H. J. (2019). Pollens destroy respiratory epithelial cell anchors and drive alphaherpesvirus infection. *Scientific Reports*, 9(1), 4787. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41305-y>
184. Van Erck, E. (2011). Dynamic respiratory videoendoscopy in ridden sport horses: Effect of head flexion, riding and airway inflammation in 129 cases. *Equine Veterinary Journal*, 43(s40), 18–24. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2011.00492.x>
185. Van Erck, E., Votion, D., Kirschvink, N., Genicot, B., Lindsey, J., Art, T., & Lekeux, P. (2004). Influence of breathing pattern and lung inflation on impulse oscillometry measurements in horses. *The Veterinary Journal*, 168(3), 259–269. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2003.09.010>
186. Vandenput, S., Istasse, L., Nicks, B., & Lekeux, P. (1997). Airborne dust and aeroallergen concentrations in different sources of feed and bedding for horses. *Veterinary Quarterly*, 19(4), 154–158. <https://doi.org/10.1080/01652176.1997.9694762>
187. Vogelmeier, C. F., Criner, G. J., Martinez, F. J., Anzueto, A., Barnes, P. J., Bourbeau, J., Celli, B. R., Chen, R., Decramer, M., Fabbri, L. M., Frith, P., Halpin, D. M. G., López Varela, M. V., Nishimura, M., Roche, N., Rodriguez-Roisin, R., Sin, D. D., Singh, D., Stockley, R., ... Agustí, A. (2017). Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 195(5), 557–582. <https://doi.org/10.1164/rccm.201701-0218PP>
188. Wang, Y., Liu, K., Hu, K., Yang, J., Li, Z., Nie, M., Dong, Y., Huang, H., & Chen, J. (2016). Impact of obstructive sleep apnea on severe asthma exacerbations. *Sleep Medicine*, 26, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.sleep.2016.06.013>
189. Waselau, M., McKnight, A., & Kasperek, A. (2020). Magnetic resonance imaging of equine stifles: Technique and observations in 76 clinical cases. *Equine Veterinary Education*, 32(S10), 85–91. <https://doi.org/10.1111/eve.13248>
190. Wasko, A. J., Barkema, H. W., Nicol, J., Fernandez, N., Logie, N., & Léguillette, R. (2011). Evaluation of a risk-screening questionnaire to detect equine lung inflammation: Results of a large field study. *Equine Veterinary Journal*, 43(2), 145–152. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.2010.00150.x>
191. Wichtel, M., Gomez, D., Burton, S., Wichtel, J., & Hoffman, A. (2016). Relationships between equine airway reactivity measured by flowmetric plethysmography and specific indicators of airway inflammation in horses with suspected inflammatory airway disease. *Equine Veterinary Journal*, 48(4), 466–471. <https://doi.org/10.1111/evj.12482>
192. Widmer, A., Doherr, M. G., Tessier, C., Koch, C., Ramseyer, A., Straub, R., & Gerber, V. (2009). Association of increased tracheal mucus accumulation with poor willingness to perform in show-jumpers and dressage horses. *Veterinary Journal*, 182(3), 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.08.015>

193. Witte, T. H., & Perkins, J. D. (2011). Early diagnosis may hold the key to the successful treatment of nasal and paranasal sinus neoplasia in the horse. *Equine Veterinary Education*, 23(9), 441–447. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2011.00251.x>
194. Wood, J. L. N., Newton, J. R., Chanter, N., & Mumford, J. A. (2005). Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young British racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 37(3), 236–242. <https://doi.org/10.2746/0425164054530579>
195. Wysocka, B., & Kluciński, W. (2018). The occurrence of dynamic structural disorders in the pharynx and larynx, at rest and during exercise, in horses diagnosed with mild and moderate Equine Asthma (Inflammatory Airway Disease). *Polish Journal of Veterinary Sciences*. <https://doi.org/10.24425/119042>
196. Xing, X., Jia, X., & Meng, M.–H. Q. (2018). Bleeding Detection in Wireless Capsule Endoscopy Image Video Using Superpixel–Color Histogram and a Subspace KNN Classifier. *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference, 2018*, 1–4. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2018.8513012>
197. Yang, X., Wei, Q., Zhang, C., Zhou, K., Kong, L., & Jiang, W. (2020). Colon Polyp Detection and Segmentation based on improved MRCNN. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, PP*, 1–1. <https://doi.org/10.1109/TIM.2020.3038011>
198. Yue, G., Wei, P., Liu, Y., Luo, Y., Du, J., & Wang, T. (2023). Automated Endoscopic Image Classification via Deep Neural Network With Class Imbalance Loss. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, PP*, 1–1. <https://doi.org/10.1109/TIM.2023.3264047>
199. Zakia, L., Shaw, S., Bonomelli, N., O’Sullivan, S., Zur Linden, A., Dubois, M., Baird, J., & Guest, B. (2021). Hematuria in a 3-month-old filly with an internal umbilical abscess and internal iliac artery aneurysm. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Veterinaire Canadienne*, 62(8), 877–881.
200. Zani, D. D., Rabbogliatti, V., Ravasio, G., Pettinato, C., Giancamillo, M. D., & Zani, D. D. (2018). Contrast enhanced magnetic resonance imaging of the foot in horses using intravenous versus regional intraarterial injection of gadolinium. *Open Veterinary Journal*, 8(4), 471–478. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i4.19>
201. Zuiderveld, K. (1994). Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization. In *Graphics gems IV*, 474–485. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-336156-1.50061-6>

## **Kopie publikacji i oświadczenia współautorów publikacji**



## Review

# Advances in the Diagnosis of Equine Respiratory Diseases: A Review of Novel Imaging and Functional Techniques

Natalia Kozłowska , Małgorzata Wierzbicka \*, Tomasz Jasiński  and Małgorzata Domino \* 

Department of Large Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine,  
Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; natalia\_kozlowska@sggw.edu.pl (N.K.);  
tomasz\_jasinski@sggw.edu.pl (T.J.)

\* Correspondence: malgorzata\_wierzbicka@sggw.edu.pl (M.W.); malgorzata\_domino@sggw.edu.pl (M.D.);  
Tel.: +48-22-59-36-191 (M.W. & M.D.)

**Simple Summary:** Respiratory problems are common in horses and are often diagnosed as a cause of poor athletic performance. The basic diagnostic techniques of the equine respiratory tract examination are not always sufficient for a complete diagnosis of the disease, its exacerbation, remission, or response to treatment. Therefore, advances have been introduced in the diagnosis of equine respiratory diseases. Among them, we can distinguish the high-resolution imaging modalities like computed tomography (CT) and magnetic resonance (MR) imaging. These techniques have revolutionized the capability of visualizing detailed anatomy of the upper respiratory tract, offering the practitioners an advanced view of airway pathology and allowing for appropriate management planning. On the other hand, the pulmonary function tests (PFTs), which provide sensitive assessment of small functional changes in the lungs, are able to comprehensively characterize the mechanics of the respiratory system. Spirometry and impulse oscillation system (IOS) analyze intra-breath respiratory mechanics, while electrical impedance tomography (EIT) measures changes in lung conductivity. These methods may be successfully applied to detect airway obstruction and mechanical inhomogeneity in breathing patterns. Presented advanced diagnostic techniques comply with owners' and trainers' requirements for accurate and early diagnosis of respiratory tract disorders. This paper reviews advantages, disadvantages, and clinical applications of the advanced diagnostic techniques of the equine respiratory tract.

**Abstract:** The horse, as a flight animal with a survival strategy involving rapid escape from predators, is a natural-born athlete with enormous functional plasticity of the respiratory system. Any respiratory dysfunction can cause a decline in ventilation and gas exchange. Therefore, respiratory diseases often lead to exercise intolerance and poor performance. This is one of the most frequent problems encountered by equine internists. Routine techniques used to evaluate respiratory tract diseases include clinical examination, endoscopic examination, radiographic and ultrasonographic imaging, cytological evaluation, and bacterial culture of respiratory secretions. New diagnostic challenges and the growing development of equine medicine has led to the implementation of advanced diagnostic techniques successfully used in human medicine. Among them, the use of computed tomography (CT) and magnetic resonance (MR) imaging significantly broadened the possibilities of anatomical imaging, especially in the diagnosis of upper respiratory tract diseases. Moreover, the implementation of spirometry, electrical impedance tomography (EIT), and impulse oscillation system (IOS) sheds new light on functional diagnostics of respiratory tract diseases, especially those affecting the lower part. Therefore, this review aimed to familiarize the clinicians with the advantages and disadvantages of the advanced diagnostic techniques of the equine respiratory tract and introduce their recent clinical applications in equine medicine.

**Keywords:** respiratory system; imaging; spirometry; electrical impedance tomography; impulse oscillation system; horse; poor performance



**Citation:** Kozłowska, N.; Wierzbicka, M.; Jasiński, T.; Domino, M. Advances in the Diagnosis of Equine Respiratory Diseases: A Review of Novel Imaging and Functional Techniques. *Animals* **2022**, *12*, 381.

<https://doi.org/10.3390/ani12030381>

Academic Editors:

Francesco Ferrucci, Chiara Maria  
Lo Feudo and Luca Stucchi

Received: 3 January 2022

Accepted: 3 February 2022

Published: 4 February 2022

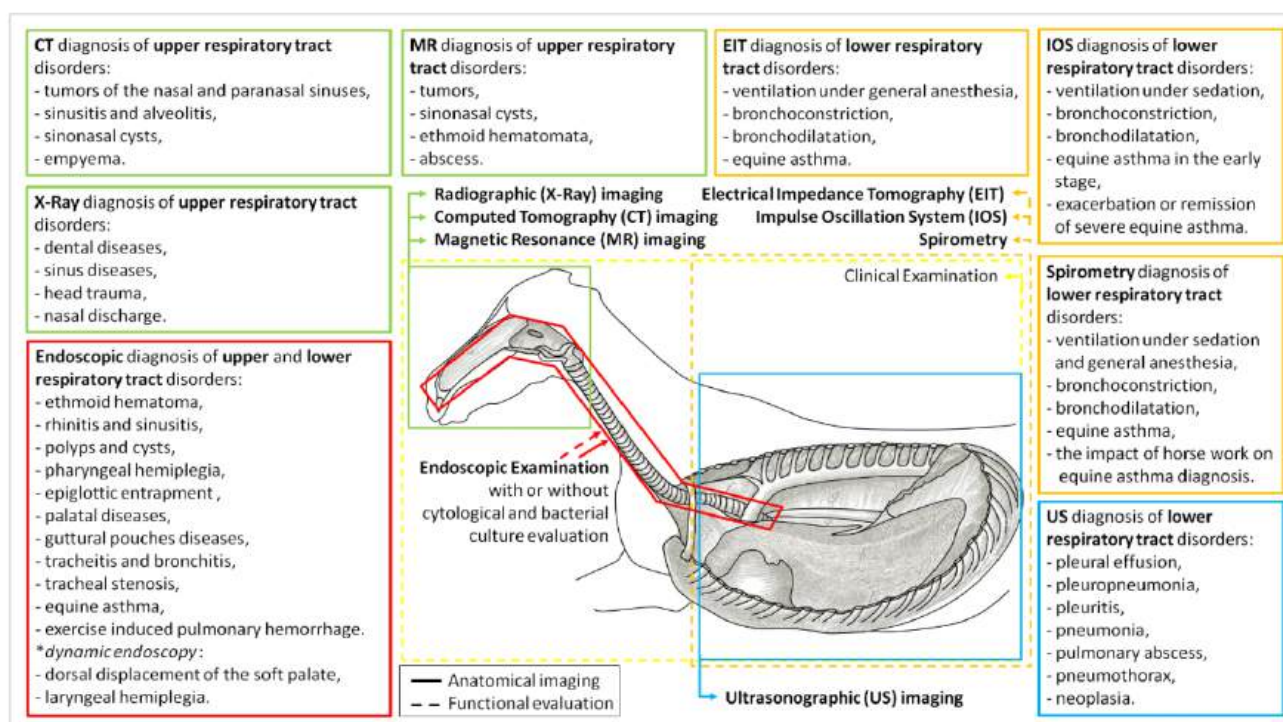
**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Taking a detailed history and performing a good clinical examination is critical to the diagnostic process of equine respiratory diseases. They often provide crucial data which narrows down the diagnostic workup plan and supports the choice of the most appropriate and informative additional examinations. In the case of the equine respiratory tract, observation of the horse from a distance is important to assess the breath rate or any symptoms of respiratory distress. Attention should also be paid to environmental conditions like bedding, ventilation, or access to the pasture. Besides the basic clinical examination, a detailed assessment of the respiratory tract needs to be performed. The respiratory examination is routinely performed in a sequence of inspection, palpation, auscultation, and—when needed—percussion [1,2]. When the basic diagnosis is established, the basic diagnostic techniques of additional examination are routinely used as the initial imaging modality in the evaluation of most common respiratory diseases. Among the basic diagnostic techniques, radiography, ultrasonography, and endoscopy are most utilized in the field of equine practice [1,3–7]. They are often adequate for diagnosis and monitoring of equine respiratory disorders, although advanced imaging techniques are still often required for more detailed assessment of anatomical structures and functional evaluation (Figure 1).



**Figure 1.** Application of the basic and advanced diagnostic techniques for the anatomical imaging and/or functional evaluation of the areas of the equine respiratory tract. CT—computed tomography; MR—magnetic resonance imaging; EIT—electrical impedance tomography; IOS—impulse oscillation system; X-ray—radiographic imaging; US—ultrasonographic imaging.

Radiography (X-ray) plays an important role in diagnosing upper respiratory tract diseases affecting the fascial, nasal, and paranasal sinus regions of the horse skull [4]. X-ray is a widely available, portable, inexpensive, and well-tolerated diagnostic technique that can be rapidly and easily obtained in both the field and hospital practices. X-ray of the horse's head is commonly used for the diagnosis of dental or sinus diseases, head trauma, or nasal discharge [5]. They allow visualization of sinuses, guttural pouches, and the upper trachea, although obtaining diagnostic quality images and interpreting these findings can be an intimidating task [4]. X-ray has inherent limitations when evaluating complex regions such as the skull or thorax due to the complexity and overlap of the anatomic

structures. X-ray is of limited value in the evaluation of soft tissue due to reduced tissue resolution. Disease processes are detected radiographically by identifying disrupted or altered contours, size or shape changes, or abnormal radiopacity, thus an adequate coverage of the area of interest is necessary for proper evaluation. These alterations can be difficult to see when there is complex anatomy [8]. To detect changes in radiopacity, mineral loss needs to be advanced at 30% to 50% to detect osteolysis or bone resorption radiographically. There are few pathognomonic findings for many of the disease processes, which can be easily established when carefully assessing the radiographic findings in conjunction with the clinical presentation.

Ultrasonography (US) is another diagnostic tool that allows inexpensive, accessible, real-time, and radiation-free imaging. This technique is implemented in the diagnosis of lower respiratory tract disorders like pleural effusion, pleuropneumonia, pleuritis, pneumonia, pulmonary abscess, pneumothorax, or neoplasia [3]. In general, US provides an assessment of pathological lesions extending mainly to the peripheral lung surface. An accurate characterization of the amount, location, and characteristics of pleural fluid or pleural thickening is easily obtained. Parenchymal lesions can be localized with high accuracy but often appear very similar and cannot be differentiated via an ultrasound examination [9]. During lung inflammation, the most common occurring artifact is comet tail, which can be detected in 91% of horses with equine asthma or exercise-induced pulmonary hemorrhage [10]. However, the comet-tail artifacts are not specific as they usually suggest the presence of a small amount of fluid, without allowing to distinguish its nature (inflammatory fluid, edema, blood, etc.) [10]. The US complements X-ray as it is easier to use, is more sensitive in the detection of smaller amounts of fluid, and provides information about the fluid character, however, it is limited to the lung surface and has a low specificity [11]. For further evaluation of the pulmonary pathology, an ultrasound-guided biopsy can be performed. Additional uses of US include doppler imaging that offers the characterization of the vascularity of masses of the thoracic wall, neck, or pleural space [3].

Rhinocopy is of great use in the case of an ethmoid hematoma, rhinitis due to foreign body, polyps, and masses causing restricted airflow [12]. It also may be useful in the case of sinusitis when there is a discharge from the nasomaxillary opening. Endoscopy of the pharynx may lead to the diagnosis of pharyngeal hemiplegia, cysts, epiglottic entrapment, or palatal disorders [2]. Visualization of guttural pouches benefits the definition of problems like mycosis, empyema, or tympany [13]. The trachea is examined to ascertain the discharge presence and appearance or to diagnose anatomic defects like tracheal stenosis [14]. Examination of large bronchi provides information about discharge presence and occurring inflammatory process in the lower airway. Under endoscope guidance or separately, broncho-alveolar lavage fluid (BALF) is collected to retrieve fluid and cells lining the distal airways and alveoli. Microscopic evaluation of BALF detects histological abnormalities in horses with pulmonary disease and is commonly used to stage equine asthma (EA) based on a percentage of neutrophils [15]. In clinically healthy young athletic horses, the distribution of nucleated cells in the BALF varies around 60% of macrophages, 34% of lymphocytes, less than 5% of neutrophils, and less than 2% of mast cells or eosinophils [16]. Horses with mild-to-moderate EA usually reveal a mild-to-moderate increase in the percentage of neutrophils, while severe EA is characterized by severe neutrophilia (>20%) [15]. Although the diagnosis of severe cases of EA is relatively easy, it is difficult to diagnose cases in remission or horses with a mild form of the disease [15].

Dynamic endoscopy, in some cases, may be the only method for diagnosis of dorsal displacement of the soft palate, especially when the symptoms occur mainly during exercise. It then also provides an assessment of laryngeal hemiplegia during horse movement [7]. Both stationary and dynamic endoscopies are available, inexpensive, and easy to perform under field conditions.

New diagnostic challenges and the growing development of equine medicine has led to the implementation of advanced diagnostic techniques successfully used in human



medicine. Among them, the use of computed tomography (CT) and magnetic resonance (MR) imaging significantly broadened the possibilities of anatomical imaging, especially in the diagnosis of upper respiratory tract diseases. Moreover, the implementation of spirometry, electrical impedance tomography (EIT), and impulse oscillation system (IOS) sheds new light on functional diagnostics of respiratory tract diseases, especially the lower part. Therefore, this review aimed to familiarize the clinicians with the advantages and disadvantages of the advanced diagnostic techniques of the equine respiratory tract and introduce their recent clinical applications in equine medicine.

## 2. Advances in the Anatomical Imaging

### 2.1. Computed Tomography (CT) Imaging of Upper Respiratory Tract

Computed tomography (CT) is an advanced technique established for the detailed imaging of the anatomical structures of the horse's head and limbs, which nowadays is becoming more available in equine clinics. The CT refers to a computerized X-ray imaging procedure where the patient is radiographed slice by slice, using a rotating, highly collimated, X-ray beam that generates cross-sectional images throughout the area of interest. The CT image is represented by a grayscale map of the tissue's ability to attenuate X-ray radiation [17]. The CT is useful in imaging primarily bones and structures containing air due to the highest and lowest ability to X-ray radiation attenuation, respectively, however, the soft tissue evaluation by contrasting imaging is also available. The CT provides high quality and resolution of the image and the possibility of three-dimension rotation of each anatomical structure [18]. In the equine respiratory tract, the applicability of CT is limited to imaging of the horse's head due to the limited diameter of the gantry, in which the examined area must be located during imaging [19]. Smaller horses and foals may fit within the gantry, allowing CT examination of the thoracic cavity and lower airways [20].

#### 2.1.1. Advantages

The CT provides diagnostically important data in situations where X-ray or US has been unrewarding. However, because of costs and the restrictions presented below, it is usually second in line after X-ray or US. The main advantage of CT is the ability to produce high-resolution, three-dimensional, detailed cross-section images [18]. The CT allows more accurate anatomic and morphologic characterization of the anatomic complexity without superimpositions of other anatomical structures within the horse's body. The CT produces images of the area of interest in various planes. It provides information about the involvement of bones and surrounding structures and may indirectly help the surgery by defining the precise surgical margins of removal [17]. As the images are objective and easy to display and share, using the services of a qualified radiologist from another part of the world is possible [21]. The CT operating systems also provide the possibility to manipulate obtained images to highlight particular structures using grey-level mapping, contrast stretching, histogram modification or contrast enhancement [19]. To evaluate lesions characterized by increased vascular permeability in the equine head, intra-arterial, and intravenous contrast enhancement can be applied [22].

#### 2.1.2. Disadvantages

Several problems related to the CT technique that have limited the availability or usefulness in equine practice can be divided into relative and absolute groups. Within the relative group, the high cost of CT equipment and facilities necessary for this imaging is still the main limitation. The monthly maintenance costs of CT scanners are very high and equipment to move anesthetized horses is also expensive [23]. As the cost of CT scanners has come down over the last years, and together with the high demand of horse owners to improve diagnostics, CT imaging is presently not restricted to a limited number of veterinary institutions and large referral centers, and slowly CT examination availability in smaller equine practices has increased [24]. The second relative problem is a need to cooperate with a qualified radiologist. Although performing a CT scan itself is



demanding but not very complicated, the viewing and assessment of a large set of highly detailed CT images requires a qualified staff, as for the untrained eye CT imaging may be incomprehensible [24]. Concerning the third relative problem of the imaging artifacts, it should be kept in mind that CT imaging is based on X-ray, ionizing, and radiation with the potential to cause biological effects in living tissues, therefore CT imaging should be done carefully to avoid artifacts and the need for repeated imaging. Within the artifacts which may limit the diagnostic value of CT by masking a lesion or by mimicking a pathologic condition, the partial volume effect and beam hardening should be included [25].

Within the much more important absolute group, the size of the CT scanner is a serious limitation in the use of CT imaging in equine practices. The CT scanners were designed for people, thus in equine practice the diameter of the gantry of the CT scanner, in which the examined area must be located during imaging, ranges from 50–85 cm and allows for insertion of the head, distal limbs, and upper neck of adult full-sized horses [19]. The entire body scan is available only in ponies or foals. Moreover, most available CT scanners require general anesthesia. The horse needs to lie on a table that slides into a gantry of CT scanners. Therefore, the necessity for general anesthesia of the horse during examination is another drawback of CT techniques. When general anesthesia is contraindicated, CT examination will also be contraindicated [18]. The option is the utilization of the modified multidetector systems to perform standing, sedated CT of the equine head. However, the CT examination in the standing position to avoid general anesthesia offers further value, but this technique is still limited to several institutions [18].

### 2.1.3. Clinical Applications

A wide range of diseases affecting the upper respiratory tract have been diagnosed successfully using CT imaging. The intravascular contrast enhancement can be used to differentiate normal soft tissue from lesions based on an alteration in vascular permeability and perfusion which significantly improves the diagnostic value of equine head CT imaging [22]. The CT examination has been proven to be valuable for surgical and treatment therapy planning, especially in progressing diseases where accurate diagnosis and surgical margins play an important role in future prognosis [26]. Precise diagnosis via CT has been emphasized in order to avoid unviable treatment approaches [27]. Malignant and benign tumors of the nasal and paranasal sinuses including squamous cell carcinoma, undifferentiated carcinoma, hemangiosarcoma, nasal adenocarcinoma, myxoma, chondroblastic osteosarcoma, anaplastic sarcoma, and fibro-osseous lesions have been described [28–31]. Henninger et al. provided detailed CT descriptions regarding the most common features of sinusitis and alveolitis [32]. Diagnosis and surgical treatment of sinonasal cysts have been described [33–35]. Solano et al. depicted CT images of empyema, even though endoscopy is the preferred method for the diagnosis process of guttural pouches [24]. Computed tomography has been reported as a tool that overcomes endoscopy and radiography in the evaluation of temporohyoid osteoarthropathy [36–38]. Both narrow [39] and larger clinical studies [32,40–42] using CT on the equine head have been performed, showing the advantages of this technique in diagnosis and therapy procedures, among which the selected clinical applications of equine CT imaging are summarized in Table 1.

**Table 1.** The selected diseases of the equine head and neck area and their main findings diagnosed based on computed tomography imaging.

| Disease   | Area <sup>1</sup> | Main Findings                                                                                                                                                                                                                                                               | Authors                                                   |
|-----------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Sinusitis | Paranasal sinuses | Thickening of the respiratory epithelium, teeth involvement. The inhomogeneous appearance of the thickened bone, sclerosis of the facial crest, deformed shape of the maxilla, irregularly defined periostitis, bone loss or perforation, soft tissue swelling of the face. | Henninger et al. (2003) [32]<br>Tucker et al. (2001) [19] |

Table 1. Cont.

| Disease                       | Area <sup>1</sup>                                 | Main Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Authors                                                                           |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Laryngeal dysplasia           | Larynx                                            | Thyroid cartilage abnormalities: lack of a cricothyroid articulation, a dorsal extension of the thyroid cartilage, absence of the caudal cornu of the thyroid cartilage, absence of the articular process of the cricoid cartilage, and hypoplasia or absence of the cricopharyngeus muscle. Thickening, heterogeneous signal intensity of thyroid cartilage laminae, the ventral and lateral aspects of the cricoid cartilage, and the ventral aspect of the first tracheal ring. The thyroid, arytenoid, and cricoid cartilages and the first tracheal ring, presence of focal areas of hyperintense signal consistent with fluid. | Garrett et al. (2010) [43]                                                        |
| Cysts and cyst-like lesions   | Larynx and cranial cervical trachea               | Thickening of the nasal mucosa. Narrowed nasal meati. Homogeneous hyperintense signal, consistent with fluid of interior of the nasal septum. Focal mineralization of the soft tissue mass. Fluid lines in one or more paranasal sinuses, dental apex flattening. Bulging and thinning of maxillary bone, partial destruction of the osseous orbit, infraorbital canal changes. Displacement and distortion of the osseous infraorbital or lacrimal canal.                                                                                                                                                                           | Garrett et al. (2010) [43]                                                        |
|                               | Paranasal sinuses                                 | Homogenous soft tissue/fluid filling the entire maxillary sinus. Expansion of right maxillary sinus with the erosion of the first molar. Large, clearly demarcated mass within the left caudal maxillary and left conchofrontal sinuses. Lysis of the sphenoid and palatine bones of the medial left orbit and left infraorbital canal. Extension into the left retrobulbar space, with rostral and lateral displacement of the left globe.                                                                                                                                                                                          | Fenner et al. (2019) [33]                                                         |
|                               | Paranasal sinuses                                 | Squamous cell carcinoma: irregularly surfaced heterogeneous soft tissue mass filling the maxillary sinus and ventral conchal sinus. Squamous cell carcinoma: soft tissue attenuation filling maxillary sinus, dorsal conchal sinus, ventral conchal sinus, while the conchofrontal and sphenopalatine sinus showed different amount of filling.                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Tucker et al. (2001) [19]                                                         |
| Tumors                        | Paranasal sinuses                                 | Nodular masses involved a third of the ipsilateral rostral maxillary sinus and less than a third of the conchofrontal sinus. Involvement of stylohyoid bone. Small nodular soft tissue lesions along the nasal septum. Dystrophic mineralized mass at the right side of the vertebral bodies of C3 and C4, associated with bone resorption that caused the thinning of the right transverse process and a widening of the angle between the transverse process and the arch of C3.                                                                                                                                                   | Annear et al. (2008) [34]                                                         |
|                               | Paranasal sinuses, nasal cavity, tongue, mandible | Hemangiosarcoma, nasal adenocarcinoma, myxoma, myxosarcoma, chondroblastic osteosarcoma, anaplastic sarcoma characterized by a homogeneous, poorly defined mass that was iso- or mildly hypoattenuating compared to masseter muscle. Osseous fibroma: well-margined mass in right nasal passage with destruction of caudal aspect of nasal septum and extension of the mass into the choanae. Rostrocaudal extent of the soft tissue density with loss of bone density in the vicinity of the cribriform plate                                                                                                                       | Kowalczyk et al. (2011) [39]                                                      |
|                               | Neck                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Strohmayr et al. (2020) [28]                                                      |
|                               | Nasal cavity, Paranasal sinuses                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | De Zani et al. (2011) [30]                                                        |
|                               | Paranasal sinuses                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Cissel et al. (2012) [31]                                                         |
|                               | Paranasal sinuses                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Cilliers et al. (2008) [29]                                                       |
| Temporohyoid osteoarthropathy | Temporohyoid articulation                         | Osseous proliferation of the stylohyoid bone and temporohyoid articulation, thickening of ceratohyoid bone. Lytic osseous changes of the petrous temporal and stylohyoid bones.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Hilton et al. (2009) [36]<br>Divers et al. (2006) [37]<br>Bras et al. (2014) [38] |

<sup>1</sup> Area of the respiratory tract; CT—computed tomography.

## 2.2. Magnetic Resonance (MR) Imaging of Upper Respiratory Tract

In horses, magnetic resonance (MR), similarly to CT, may support the diagnostic process by providing cross-sectional images of extremities and head. The MR imaging is based on the magnetic dipole nature of the abundant hydrogen protons within tissues and uses the magnetic field and radio waves to create the image of hydrated tissues [19]. The MR images excel in the evaluation of soft tissues, providing anatomic and physiologic infor-

mation that exceeds tomographic images. The standard image can be acquired in desired orientation, however the commonly obtained planes are sagittal, transverse, and dorsal [44]. Routine MR imaging examinations of the head include three types of pulse-echo sequences: the T1-weighted (T1W) sequence, which is performed before and after contrast administration; proton density (PD); and T2-weighted (T2W) imaging protocols. However, additional imaging sequences may be used [44]. The T1W sequences are based on the longitudinal relaxation properties of tissue and are useful for anatomic detail. T1W images acquired immediately after intravenous contrast administration are compared with identical slices obtained before contrast to detect neovascularisation or dilatation of vessels. Contrast enhancement results in a hyperintense signal in tissues where the contrast has extravasated. PD images are based on the relative concentration of hydrogen protons in different tissues and have the best anatomic detail. T2W images are based on the relaxation interactions between protons [19]. In the equine respiratory tract, the applicability of the high-field closed MR is much more limited than in CT due to the both small gantry diameter and the need to place the center of the imaged object in the center of the gantry [19]. Therefore, the high-field MR imaging of the horse's head, but no further, is available under general anesthesia only for ponies, foals, or the rostral part of larger horses. The equine low-field MR scanners provide an examination in standing sedated horses; however, the scanner should include a specific system, which is not the same as the small system designed for the equine limb scanning [45,46].

#### 2.2.1. Advantages

The MR provides completely different diagnostically important data than CT, X-ray, or US. The main advantage of MR is the type of acquired data, providing not only excellent anatomic features of soft tissue structures but also functional alterations elusive in other imaging techniques. The MR does not use ionizing radiation, thus no negative biological effects in living tissues have so far been demonstrated [44]. In the equine respiratory tract, MR imaging is particularly useful for identifying space-occupying lesions (tumors, sinonasal cysts, or ethmoid hematomata), where the high soft-tissue contrast of the images is needed to allow differentiation of tissue types and establish an accurate relationship with surrounding structures [42]. The second advantage of MR is the ability to produce high-resolution, three-dimensional, detailed cross-section images which can be accomplished in any plane, without a loss of resolution or quality regardless of the orientation of the horse's head in the magnetic field [19].

#### 2.2.2. Disadvantages

The main disadvantage of the MR technique in equine practice is similar to CT imaging limitations, and also could be divided into relative and absolute groups. Within the relative group, as it was noted for CT that the high cost is still the main limitation, it has to be realized that the costs of MR equipment and facilities are extremely high. The MR magnet, especially in the high-field MR, requires a constant high voltage power supply and continuous cooling with the use of liquid helium, even when no imaging is being performed.

Therefore, the monthly maintenance costs of MR scanners are much higher than those of CT [8]. Moreover, in the case of working in a strong magnetic field, specialized non-metallic equipment for anesthesia, monitoring, and the procedure are needed with special precautions [8], therefore MR imaging is still restricted to a limited number of veterinary institutions and large referral centers. The second relative problem is a need to cooperate not only with a highly qualified radiologist, but also close cooperation with a biophysicist or specialized technical support from the MR service company [47]. In the case of MR, both performing an MR scan and viewing and assessing MR images requires narrow, high-quality MR specialist competencies. For the novice, interpretation of MR images can be more challenging than interpretation of CT scans because of the influence of the many patients- and machine-related factors on the gray-scale display. The principles of image contrast are unfamiliar and follow rules that are not as evident or straightforward [47].

Although three routine sequences are mainly used for MR imaging of horses' heads, standardization of protocols and specialist technique knowledge is required to achieve high-quality images [19].

As it was mentioned above, the size of the MR scanner is a serious limitation in the use of high-field MR imaging in equine practice, which should be mentioned as an important absolute disadvantage. The gantry diameter allows for the distal limb and rostral part of the head to be introduced in the center for image acquisition [8]. Moreover, the center of the imaged object has to be positioned in the center of the gantry [8], therefore the high-field MR is available only for ponies or foals. The other option is the utilization of low-field, semi-open MR scanners to perform standing, sedated MR of the equine head. However, the quality, resolution, and number of available imaging sequences are much poorer than in high-field MR imaging [47]. Concerning the second absolute problem, the target tissue, it should be kept in mind that MR imaging displays limited clinical use in the lungs and bones evaluation. MR imaging of the foal thorax may be limited due to the sparse soft tissue structures and low proton density for signal production [48]. Moreover, multiple interfaces between air and soft tissue generate susceptibility artifacts and fast signal decay, as in high-field images the field inhomogeneity susceptibility increases with the increase of air it contains. Therefore, the low proton density-dependent artifacts are prevalent, especially on the boundary of air-containing sinuses as well as bone–soft tissue interfaces. The motion of respiratory, cardiac, and vascular systems may also cause artifacts except when the respiratory/ECG gating is available [8]. Finally, in the case of selected horse head disorders, small lesions affecting flat bones of the skull occur which are not detectable on MR images. Thus, for bone imaging CT images are more detailed [19]. However, the decision between CT and MR depends not only on the target tissue, but also, and perhaps most of all, on the time that can be spent on imaging. The MR imaging takes much more time than performing a CT scan, which is not without significance in the case of unstable horses during general anesthesia.

### 2.2.3. Clinical Applications

Due to the above limitations, a variety of clinical MR applications in equine practice have been reported regarding limbs [49–51], while head MR imaging has a limited number of cases. Ferrell et al. presented the clinical application of diagnosis of neurologic diseases in twelve horses, wherein eight of them were successfully diagnosed using MR imaging [52]. Spoormakers et al. assessed the application of MR in equine brain abscesses imaging [53]. A larger study was performed by Manso-Diaz et al., where in 84 clinical cases MR imaging showed the exact location, size of the lesions, and relation to surrounding structures due to neurological, sinonasal, and soft tissue disorders. The disorders of the respiratory tract diagnosed there by MR imaging included sinusitis, dental issues, nasal tumors, nasal septum deviation, and ethmoid hematoma [42]. In the report by Tessier et al., the MR imaging technique was used to diagnose sinusitis, paranasal sinus cysts, ethmoid hematoma, and neoplasia [54]. Garrett et al. reported MR as an advanced imaging method of larynx and pharynx, presenting MR features of laryngeal dysplasia and laryngeal cyst-like malformation [43,55,56]. Potentially, the MR might be a superior imaging technique in the diagnosis of foal lung diseases, following the experiences from human medicine. In human medicine, there are reports where magnetic resonance has been compared with high resolution computed tomography (HRCT) in pneumonia diagnosing. In three reports, the MR imaging had 91% [57], 94% [58], and 95% [59] accuracy, respectively, in the diagnosis of pneumonia compared to HRCT with 100% accuracy. The selected current clinical applications of equine MR imaging of the respiratory tract are summarized in Table 2.

**Table 2.** The selected diseases of the equine head and neck area and their main findings diagnosed based on magnetic resonance imaging.

| Disease             | Area <sup>1</sup>     | Main Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Authors                       |
|---------------------|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Cyst                | Paranasal sinus       | Homogeneous<br>On T1W sequences, the cyst was hypointense compared to temporal muscles, no contrast enhancement within the cystic fluid.<br>rim enhancement<br>On T2W sequences, the contents were hyperintense to surrounding muscle, and a wall could be observed consistently surrounding the lesion. This rim was observed consistently around the lesion and could be differentiated from the adjacent mucosa. | Tessier et al. (2013) [54]    |
| Abscess             | Ventral Conchal sinus | Well-defined capsule with heterogeneous signal intensity in T2W images, deviation of the dorsal conchal sinus wall, and infraorbital canal.                                                                                                                                                                                                                                                                         | Manso Diaz et al. (2015) [42] |
| Tumors              | Nasal septum          | Chondrosarcoma: heterogeneous intensities on all sequences and no defined borders of the lesion.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Tessier et al. (2013) [54]    |
|                     | Middle nasal meatus   | Osteoma: irregularly shaped mass that was hypointense on both T1W and T2W images, containing small foci isointense to muscle on T2W images, maxillary bone atrophy.                                                                                                                                                                                                                                                 | Manso Diaz et al. (2015) [42] |
|                     | Nasal cavity          | Lymphoma, squamous cell carcinoma: expansile, heterogeneously, and moderate contrast-enhancing mass with complete occlusion of the nasal cavity. Lack of a cricothyroid articulation, dorsal extension of the thyroid cartilage, absence of the caudal cornu of the thyroid cartilage, absence of the articular process of the cricoid cartilage and hypoplasia, or absence of the cricopharyngeus muscle.          | Garrett et al. (2009) [55]    |
| Laryngeal dysplasia | Larynx                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                               |

<sup>1</sup> Area of the respiratory tract; MR—magnetic resonance, T1W—T1 weighted image, T2W—T2 weighted image.

### 3. Advances in the Functional Evaluation

The above basic and advanced imaging techniques predominantly provide data of normality or alterations of the anatomical structures of the respiratory tract. The adaptation of the pulmonary function tests (PFTs) to equine medicine significantly expands the possibilities of the functional evaluation. In contrast to static imaging techniques that allow the direct visualization of the area of interest to diagnose changes like mucus, fluid accumulation, neoplastic changes, or other anatomical abnormalities, dynamic PFTs provide information about the respiratory system in motion. Examples of dynamic measurement are pulmonary resistance and dynamic compliance, which are reliable indicators for air-flow obstruction changes [60]. Respiratory abnormalities generally increase respiratory impedance in breathing, and a reduced level of ventilation can be detected objectively by deterioration in breathing mechanics [61]. The PFTs are valuable, noninvasive tools in the investigation and monitoring of breathing mechanics of patients with respiratory diseases. These techniques aid diagnosis, help monitor response to treatment, and can guide decisions regarding further treatment and intervention [62]. However, the PFTs alone cannot be expected to lead to a clinical diagnosis. Further studies on the normal values and appearance of flow-volume curves in equine medicine are required to improve the interpretation of the PETs in horses [63]. Therefore, the PET results should be evaluated in the light of history, physical examination, and diagnostic imaging results.

Among PFS available in human medicine [62], spirometry, electrical impedance tomography, and impulse oscillation systems have been applied to the horses and have enabled tremendous advances in the clinical performance evaluation of the equine athlete [64–66]. The selected clinical applications are summarized in Table 3.



**Table 3.** The selected diseases of the equine lung area and their main findings diagnosed based on the consecutive pulmonary function tests.

| Function                                                                                                                     | Technique                              | Area <sup>1</sup> | Main Findings                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Authors                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Monitor ventilator volumes and respiratory mechanics, control the depth of the anesthesia                                    | Spirometry with pilot-based flow meter | Lungs             | Measurement of tidal volume and minute volume, dynamic compliance (C <sub>dyn</sub> ) of the respiratory system. Visual presentation of pressure-volume (PV) and flow-volume (FV) loop of each breath, representing the compliance (PV) and resistance (FV) of the respiratory system.                                                                                                                        | Moens et al. (2010) [67]    |
| Correlation of spirometry results and percentage of neutrophils (N%) in tracheal aspirates                                   | Spirometry                             | Lungs             | Wide variation in N% in tracheal aspirates of clinically normal horses with poor racing performance, spirometry results significantly correlated with measurements of N% in tracheal aspirates.                                                                                                                                                                                                               | Evans et al. (2011) [68]    |
| Comparison of tidal breathing flow-volume loop (TBFVL) of healthy horses and horses suffering from mild and to severe asthma | Spirometry                             | Lungs             | Disease-related differences in TBFVL indices are affected by the type of work undertaken by a horse.                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Herholz et al. (2003) [69]  |
| Measurement respiratory rate, tidal volume, peak inspiratory and expiratory flows, time to peak flow in healthy horses       | Spirometry                             | Lungs             | Measurements were repeatable and reproducible, however variable breathing patterns within the same day and on a breath-to-breath basis were present.                                                                                                                                                                                                                                                          | Burnheim et al. (2016) [64] |
| Effect of sedation and salbutamol administration on tidal breathing                                                          | Spirometry                             | Lungs             | After sedation, minute ventilation was reduced in association with reduced respiratory rate and decreased expiratory and inspiratory flows. Relative expiratory time was reduced after xylazine, and peak expiratory flow occurred later in the respiratory cycle. Salbutamol administration has a significant effect on most parameters except the increase in peak inspiratory flow during tidal breathing. | Raidal et al. (2017) [70]   |
| Monitoring of ventilation during anesthesia                                                                                  | EIT                                    | Lungs             | Inspiratory breath-holding and the redistribution of gas from ventral to dorsal regions of the lung after recovery from general anesthesia.                                                                                                                                                                                                                                                                   | Mosing et al. (2016) [71]   |
| Monitoring of recruitment maneuvers (RM) during anesthesia                                                                   | EIT                                    | Lungs             | During recruitment maneuvers, ventilation in independent ventral region.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Ambrisco et al. (2015) [72] |
| Detection of bronchoconstriction and bronchodilatation                                                                       | EIT                                    | Lungs             | EIT-derived flow indices for ventilation significantly changed after histamine administration and returned to control values with subsequent albuterol administration.                                                                                                                                                                                                                                        | Secombe et al. (2021) [73]  |
| Effect of sedation and salbutamol administration on tidal breathing                                                          | EIT                                    | Lungs             | Healthy horses have lower peak expiratory and inspiratory flow compare to horses with mild or severe asthma after exercise.                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Herteman et al. (2021) [65] |
| Diagnosis and monitoring of equine asthma                                                                                    | IOS                                    | Lungs             | IOS parameters in the low-frequency range were sensitive indicators of early methacholine-induced bronchoconstriction. IOS measurements were reliable and repeatable.                                                                                                                                                                                                                                         | Van Erck et al. (2003) [74] |
| Standardization of IOS measurements                                                                                          | IOS                                    | Lungs             | Age, sex, and bodyweight did not influence IOS measurements. Measurements from 5 to 15 Hz were found to be most relevant.                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Van Erck et al. (2004) [75] |
| Effects of sedation on lung airflow                                                                                          | IOS                                    | Lungs             | Inspiratory parameters were found to be significantly dependent on the time course of sedation, whereas expiratory parameters were not influenced.                                                                                                                                                                                                                                                            | Klein et al. (2006) [76]    |
| Diagnosis and staging of equine asthma                                                                                       | IOS                                    | Lungs             | Significant changes were present between horses in exacerbation of EA and control horses within inspiratory and expiratory parameters. The delta reactance ( $\Delta X$ ) shows the presence of tidal expiratory flow limitation (EFLt) and dynamic airway compression in SEA horses in exacerbation of the clinical signs.                                                                                   | Stucchi et al. (2022) [77]  |

<sup>1</sup> Area of the respiratory tract; EIT—electrical impedance tomography; IOS—impulse oscillometry system.

### 3.1. Spirometry Evaluation of Lower Respiratory Tract

Spirometry is designed to identify and quantify functional abnormalities of the respiratory tract. In humans, the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease recommends spirometry as a diagnostic technique in earlier diagnosis and treatment monitoring in chronic obstructive diseases [78]. In medicine, spirometry provides absolute measures of respiratory function in a simple, reliable, and economical manner. Operating principles are based on three bidirectional pilot flow sensors connected to the face mask that measure breath-by-breath airflow with high resolution [79].

Spirometry begins with a full inspiration, followed by a forced expiration that rapidly empties the lungs. Expiration is continued for as long as possible or until a plateau in

exhaled volume is reached. Both efforts during inspiration and expiration are recorded and graphed, demonstrating respiratory frequency, tidal volume, peak inspiratory and expiratory flows, time to peak flow, and forced vital capacity, which is an important spirometric maneuver. The forced vital capacity measurement requires the maximal inspiration followed by the rapid expiration, which should be as complete as possible [79]. Such maneuvers have been performed in horses; however, the use of general anesthesia was necessary to avoid interference of conscious respiratory movements with emptying of the lungs [60,80].

In human medicine, spirometry is the gold standard in the diagnosis of lower obstructive respiratory diseases [78], therefore the adaptation of measurement to the horse practice seems to be a promising advancement in the functional diagnosis of equine respiratory diseases. However, in equine medicine spirometry is still restricted to the university centers, and there is a lack of standardized protocol for horse lung investigation [60,64,67–70,81–86].

#### 3.1.1. Advantages

Spirometry provides repeatable and reproducible data of the respiratory function in horses without the need of very expensive and advanced equipment, contrary to CT and MR imaging. Spirometry is a non-invasive technique that does not require the use of ionizing radiation; moreover, it is well tolerated by horses [82,83]. Therefore, spirometry may be conducted on non-sedated horses in standing position [83], however, the application for a horse's respiratory function monitoring under sedation [70] and general anesthesia [68] is also available. Cooperation with a qualified specialist is required at the beginning for gaining experience with spirometry examination, as the obtained data are simple in interpretation by the practitioners both at rest and during exercise [82,83].

#### 3.1.2. Disadvantages

The main disadvantage of the introduction of spirometry to the equine practice is the necessity of the horse's cooperation to perform voluntary breathing maneuvers [81]. Because getting a non-sedated horse to maximal inspiration followed by the rapid, deep expiration [79] is almost impossible, in equine medicine spirometry cannot be used in the same manner as in human medicine [78]. Therefore, in horses the spirometry-based pulmonary function tests are dependent on involuntary breathing which can be done with much less cooperation from the horse [67–70,82–86]. However, the horse still needs to be cooperative with wearing a mask which might be challenging or time-consuming depending on the horse's activity and temperament [69]. The need to accurately fit the mask to the horse's head also requires possession of numerous masks so that they can be used for foals, ponies, and full-size horses [86]. Moreover, a certain period of training and acclimatizing horses to spirometric procedures is required to achieve informative data [64]. It should be kept in mind that the horses exhibit a significant respiratory reserve, ventilation, and are subject to rapid change in response to excitement, fear, and other emotional states. One should mention the individual variations and age, sex, and usability-related differences in inflow parameters as the spirometry limitations [64,69,82,83]. Therefore, larger studies to evaluate protocols for equine spirometry are required to move spirometry to the next stage of clinical development in equine medicine.

#### 3.1.3. Clinical Applications

Spirometry has been primarily used to characterize the normal equine tidal breathing flow-volume loop in healthy horses and ponies [82,83]. Afterward, Connally et al. measured the maximal expiratory flow-volume loops in horses exercised on a treadmill, finding no marked difference between clinically normal horses and those with airway obstruction [84]. Further reports revealed changes in breathing strategy and disappearance of biphasic airflow pattern in horses with asthma [69,85]. Herholtz et al. provided strong evidence of the impact of horse work on the differentiation ability in diagnosing different degrees of asthma, as the disease-related differences in spirometry-based measures may consequently

be obscured by the type of work undertaken by a horse [69]. Moreover, Burnheim et al. indicated high variability of results across days rather than within traces obtained on a single day with preserved high repeatability and reproducibility [64]. These reports suggest the need for further bigger studies to evaluate protocols for equine spirometry.

Raidal et al. used spirometry for evaluation of the effect of xylazine, acepromazine, and salbutamol on lung function in horses where respiration was significantly reduced by the sedative agents in comparison to salbutamol, where no significant changes were noticed except increased peak inspiratory flow [70], whereas previous studies have suggested that bronchodilation therapy has little effect on healthy horses [86]. Moens et al. investigated the continuous measurement of tidal and minute volume on a breath-to-breath basis in anesthetized horses and concluded that spirometry was useful in the detection of changes like depth of sedation or non-fitted tracheal cuff [68].

Among the direct clinical applications of spirometry in the diagnosis of equine respiratory diseases, the spirometry-based early diagnosis of equine asthma was investigated [60,67]. Evans et al. correlated the percentage of neutrophil from tracheal aspirates with spirometry results obtained after exercise and reported that horses with a higher percentage of neutrophils in tracheal aspirates consistently had lower flowtime curves during the second half of both inspiration and expiration [68]. These lower values may be attributed to narrowed airways due to inflammatory exudate, dynamic collapse, and/or airway hyperreactivity associated with asthma. Therefore, the need for pulmonary testing in combination with cytology for compressive diagnosis of equine asthma was strongly suggested [67].

### 3.2. Electrical Impedance Tomography (EIT) Evaluation of Lower Respiratory Tract

Electrical impedance tomography (EIT) is a non-invasive, radiation-free, real-time imaging modality which allows the assessment of lung ventilation and perfusion [87]. The EIT reconstructs a cross-sectional image of the lung's regional conductivity using electrodes placed circumferentially around the thorax. During EIT examination, a weak alternating current of high frequency and low amplitude is applied between an adjacent pair of electrodes and resulting surface potentials are measured by the remaining electrodes. The measured potentials depend on the tissue bioimpedance and are used to create the functional image of the lower respiratory tract [88]. The tissue bioimpedance changes depending on the fluid content, ion concentration, fat accumulation, or amount of air. Therefore, pathological changes of the tissue composition such as pleural effusion, lung fibrosis, or alveolar fluid accumulation can be easily detected by EIT [87].

In human medicine, EIT is frequently used for functional chest examinations, especially for monitoring regional lung ventilation in mechanically ventilated patients, and for regional PFT in people with chronic lung diseases [87]. The EIT is well situated for adults, neonates, and pediatric patients [89]. In the veterinary field, EIT is at an early stage of clinical development, however, in equine medicine the global and regional peak respiratory flows have recently been investigated [73,90–93].

#### 3.2.1. Advantages

The EIT provides functionally unique clinical data of the lower respiratory tract ventilation which is difficult to obtain by other diagnostic techniques. The data are real-time measured and thus reflect continuous ventilation [94]. The EIT allows for the analysis of the individual region of interest in the lung and comparison, for example, of the dorsal with ventral parts of lung regions, the right and left lung, or the same regions that underwent different conditions [65,93]. The electrical currents used by EIT are imperceptible and safe for body surface application with no ionizing radiation exuded [83]. In contrast to CT and MR imaging and similar to spirometry, the equipment and facilities are affordable; easy to implement; well-tolerated by standing, non-sedated horses; and portable, which makes the EIT system suitable for the field conditions [90]. Electrodes are mainly integrated into one electrode belt which makes the application more user-friendly. The EIT working



principle does not limit its use to any size of animal, thus the EIT belt can be adjusted to small and full-sized horses [65,95]. Cooperation with a qualified specialist is required during the first period of operation with the EIT belt, but quick and friendly training can also be done online [87]. As reconstruction algorithms have already been adapted to the horse anatomy [65,90,96], the possibility of the EIT application in equine clinical practice has significantly increased.

### 3.2.2. Disadvantages

Despite many advantages, the EIT imaging modality shows several limitations. EIT is characterized by very low spatial resolution compared with other imaging techniques, such as CT or MR imaging [93]. The EIT images represent a single cross-section of the thorax [89], whereas CT and MR provide three-dimensional images constructed based on the numerous detailed cross-sections [19]. Other disadvantages are the complexity of EIT data and susceptibility to artifacts. For the understanding of obtained data, specialized training is needed, however, compared to other advanced techniques described here, getting started with the EIT is relatively easy [87]. Concerning the alterations in obtaining data, any patient movement or touching of electrodes during EIT data acquisition leads to the production of the artifacts and thus anatomical and functional distortion. The horse needs to stand quietly, which sometimes may be challenging, and artifacts may still be produced due to gross movement of muscles from muscle fasciculations, interactions with the investigator, sniffing, scratching, or fat tissue accumulation. However, contrary to CT and MR imaging and similar to spirometry, neither general anesthesia or sedation are required [65]. Finally, it should be kept in mind that the EIT in equine medicine is still at an early stage of clinical development, therefore some references and protocols still need to be established [73].

### 3.2.3. Clinical Applications

The first studies on the EIT application in equine practice have focused on the assessment of ventilation in healthy standing horses [65,93]. Regional distribution of ventilation, the left-to-right lung region impedance ratios, and ventral-to-dorsal lung region impedance ratios were calculated. In healthy physiologically breathing horses, the right lung received a larger fraction of the tidal volume than the left, and the ventral-dependent lung region was more ventilated than the dorsal nondependent one [72]. Schramel et al. described the shift of regional ventilation towards dorsal nondependent regions in progressing pregnancy ponies that reversed seven days after foaling [95].

Application of EIT in anesthetized horses has been well described by Mosing et al. [71]. The EIT-based evaluation of the breathing pattern, distribution of ventilation, and gas exchange during anesthesia revealed the phenomenon of inspiratory breath-holding and the redistribution of gas from ventral to dorsal regions of the lung after recovery from general anesthesia [97]. The phenomenon of auto-recruitment by breath-holding has not been described previously and thus shed new light on horse anesthetized lung function. Mosing et al. also compared the lung function in spontaneously breathing and controlled mechanical ventilation anesthetized horses. In the spontaneously breathing horses, ventilation was essentially centered within dorsal regions of the lungs, while during controlled mechanical ventilation it shifted towards ventral regions [71]. Auer et al. repeated a similar protocol on the lateral recumbent ponies. The ventral shift of the ventilation region was explained by the loss of dorsal movement of the diaphragm when switching from spontaneous ventilation to controlled mechanical ventilation [98].

Moens et al., Wettstein et al., and Mosing et al. made an effort for a better understanding of horse ventilation by applying EIT measurements for continuous monitoring of the dynamic changes in the distribution of ventilation [71,93,99]. The EIT has been proposed as a monitoring tool in alveolar recruitment maneuvers in horses [93,97]. In alveolar recruitment maneuvers, lung opening is based on the implementation of sufficient peak inspiratory pressure and the immediate application of partial end-expiratory pressure [99]. These high airway pressures inevitably induce cardiovascular and pulmonary side ef-

fects such as decreases in cardiac output and blood pressure, as well as overdistension of lung parenchyma which results in augmented dead space fractions [93]. Therefore, positive end-expiratory pressure should be adjusted to the lowest pressure that prevents alveolar decruitment [93]. It is worth noting that the EIT-measured effects of the peak inspiratory pressure and partial end-expiratory pressure on the distribution of ventilation were in line with spirometry results in horses [73]. Moreover, the application of EIT in dorsally recumbent anesthetized horses allows for establishing the level of continuous positive airway pressure at which the number of silent spaces in the dependent parts of the lungs decreases [100]. However, to implement this ventilation strategy in clinical practice, the widespread awareness of the possible use of EIT or other appropriate monitoring tools in equine medicine needs to be greatly increased [101,102].

Among the direct clinical applications of the EIT in equine practice, recent research described the global and regional peak respiratory flows in the horses that underwent histamine challenges and drug-induced bronchodilatation [73,90], as well as those suffering from equine asthma [96]. The main component of equine asthma, a chronic disease that greatly affects the horse's physical capacity, is airway inflammation that causes bronchoconstriction with recurring obstruction of air passages, excessive mucus production, and bronchial and pulmonary hyperresponsiveness [103]. It is worth noting that the EIT measurements proved to be effective in the evaluation of histamine-provoked bronchoconstriction in horses [73,90]. Horses were nebulized using histamine saline, and the total impedance change during inspiration and expiration, peak global inspiratory, and peak expiratory global flow were evaluated by calculating the first derivative of the EIT volume signal. In both studies, inspiratory and expiratory global EIT flow variables incrementally increased with bronchoconstriction. A reversal of airflow changes induced by the administration of albuterol after histamine challenge was also EIT detectable [73]. In subsequent studies, EIT was implemented to compare effort-dependent ventilation between horses with asthma and the healthy group. The global expiratory flow was significantly higher in horses affected with mild and severe asthma after 15 min of exercise of the lunge. In horses with airway obstruction, the breathing strategy changes, and the biphasic airflow pattern disappears [90]. In healthy horses, the normal breathing strategy is reflected by a biphasic inspiratory and expiratory airflow pattern [82]. In asthmatic horses, the increase in global flow is more pronounced during expiration, with an increase of 94% compared to inspiration during which an increase of 83% was observed. The EIT measurements proved that asthma affects expiration more than inspiration [65].

### *3.3. Impulse Oscillation System (IOS) Evaluation of Lower Respiratory Tract*

The impulse oscillometry system (IOS) is a non-invasive effort-independent functional modality that allows for measuring both airway resistance (R) and airway reactance (X) [95]. The IOS gains a huge interest in pediatrics, wherein younger children's ability to follow instructions is not required [104]. For a similar reason, the IOS successfully has been introduced into the veterinary field. In the equine application, the harmonic sound waves generated by a loudspeaker flow through the horses' respiratory tract [66]. The harmonic sound waves may flow through the tube attached to the face mask during IOS examination on a standing, non-sedated horse or to the endotracheal tube during anesthesia. Therefore, the IOS may be applied in both clinical applications [75]. A loudspeaker generates the single or multiple frequency harmonic sound waves, which usually range from between 1 and 5 Hz to between 10 and 25 Hz. The impulses generated by the loudspeaker travel superimposed during normal tidal breathing through the large and small airways. Higher frequency harmonic sound waves penetrate out to the lung periphery, thus reflecting the large airways, whereas lower frequency waves travel deeper into the lung reflecting the lower airways. Finally, the inspiratory and expiratory flow and pressure are measured by the pressure and flow transducers [104]. The pressure and flow signals are separated from the breathing pattern by signal filtering. The signal coming back from the airways carries the data representing respiratory impedance which is the sum of all the resistance

and reactance opposing the IOS-produced oscillations. The air resistance (R) is a force proportional to energy required to propagate the pressure wave through the airways, whereas the air reactance (X) is another force proportional to the amount of recoil generated against that pressure wave [104].

### 3.3.1. Advantages

The IOS provides reliable, repeatable, and informative pulmonary functional data of the lower respiratory tract [75], completely different than the data obtained with other diagnostic techniques described. Therefore, it seems to be a very good complement, not a replacement for the basic and advanced diagnostic techniques of the equine respiratory tract. The IOS is non-invasive, fast, and easy to calibrate, and does not require the use of either ionizing radiation or electrical currents. Similar to spirometry and EIT, the equipment and facilities are affordable, portable, easy to implement, and well-tolerated by standing, non-sedated horses, thus the application of the IOS in the field conditions is promising [77]. Contrary to classic spirometry, the IOS requires only passive horse cooperation which is a great advantage in veterinary practice [77] and is the second indicator of applicability for field measurements in equine medicine. Cooperation with a qualified specialist is required during the first measurements conducted with the IOS, and online support of acquired data interpretation is also available [66].

### 3.3.2. Disadvantages

Although the IOS has many useful promising clinical applications, the examination protocol is subject to some limitations. Despite the IOS protocol being effort-independent, the horse still needs to be cooperative, especially regarding wearing a mask that sometimes might be challenging and time-consuming [77]. Moreover, similar to spirometry, the horse masks need to be adjusted for each horse to avoid air leaks that may interfere with results. Thus, buying a wide spectrum of facemasks is needed to fit them properly to foals, small, and full-sized horses [66]. Maybe for this reason, despite the many advantages, the IOS is currently restricted to research institutions and referrals [66]. Moreover, similar to both spirometry and EIT, the IOS in equine medicine is still at an early stage of clinical development, and research remains ongoing regarding the protocols, interpretation, and clinical application in horses, although more reports are still needed [66].

### 3.3.3. Clinical Applications

Van Erc et al. made a cornerstone in equine IOS application, providing the normal reference values for adult horses and standardizing the examination protocol concerning the effect of unfitted masks or position of the head. The horse's gender, age, and general physical morphology determined by individual biometrics did not significantly affect the results of IOS measurements [75]. In other studies, van Erck et al. reported that bronchoconstriction resulted in an increase in R at 5 Hz and a decrease in X at 5, 10, 15, 20 Hz frequencies. Young et al. confirmed those results, however, at frequencies between 1 and 3 Hz [74]. Klein et al. investigated the effect of xylazine sedation on the IOS parameters and revealed significant alterations mainly during inspiration [76]. Richard et al. revealed the significant increase in R and decrease in X at lower frequencies 1–10 Hz in a horse group with mild equine asthma [105]. These promising results direct further research towards the assessment of the suitability of the IOS in the diagnosis of equine asthma at an early stage. Stucci et al. initiated the measurement of the Delta X ( $\Delta X$ ) in a horse's respiratory tract, and defined  $\Delta X$  as the difference between the inspiratory and expiratory reactance at each frequency [77]. In human medicine,  $\Delta X$  is used in the detection of tidal expiratory flow limitation in chronic obstructive pulmonary disease and human asthma [106]. Based on the Stucci et al. results,  $\Delta X$  could be used in monitoring the exacerbation or remission of the clinical signs of severe equine asthma and healthy controls, indicating the important clinical application of the IOS in the diagnostic and treatment of diseases of the lower equine respiratory tract [77].

#### 4. Future Development and Practical Applications

In human medicine, specialized centers for respiratory diseases are present and the future may lead to development of similar facilities for horses, as respiratory problems highly impact the equids population. In many cases, the complexity of respiratory disorders makes the full diagnosis under field conditions inapplicable. Thus, specialized centers fully equipped to provide comprehensive diagnoses are needed. Except for the endoscopes and US machines, the remainder of the specialized equipment is not portable. Ambulatory X-ray systems are not suitable for thoracic radiography in adult horses, this area can only be achieved using high powered X-rays which are mainly stationary. Lung function tests are a very promising tool, especially regarding the worldwide occurrence of EA. Early asthmatic horses may not show recognizable signs, but their airway hyperactivity can be detected using a pulmonary function test. PFTs may be especially helpful in early diagnosis of high-performance horses where the smallest amount of respiratory disease may affect the future outcome. PFTs may be also helpful in the evaluation of response to treatment protocol and are more sensitive than BALF retake. Hopefully high demand from the owners and trainers will result in the wide implementation of those techniques in equine respiratory diseases diagnosis, as it would support effective management of affected horses, improve the outcomes, and improve the horses' welfare.

#### 5. Conclusions

Huge improvements have been observed in the last decades and continuous technical progress is changing the capability of the diagnostic techniques, allowing for more accurate anatomical and functional studies of the equine respiratory tract. Within the advanced techniques, the sensitive diagnostic modalities like CT or MR have provided the detailed anatomical features of upper respiratory tract diseases, allowing for the exact visualization of changes and providing vital information for surgical staff in the case of a planned procedure. The further implementation of pulmonary function tests is promising as a non-invasive tool to facilitate an earlier diagnosis of equine lower respiratory tract diseases, especially in the case of equine asthma. However, more studies in the presented field are needed to create protocols that may be widely implemented by equine practitioners.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.K. and M.D.; methodology, N.K. and M.D.; resources, M.W. and T.J.; writing—original draft preparation, N.K. and M.D.; writing—review and editing, M.W. and T.J.; visualization, N.K. and M.D.; supervision, M.W. and M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Roy, M.-F.; Lavoie, J.-P. Tools for the Diagnosis of Equine Respiratory Disorders. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2003**, *19*, 1–17. [[CrossRef](#)]
2. Savage, C.J. Evaluation of the Equine Respiratory System Using Physical Examination and Endoscopy. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **1997**, *13*, 443–462. [[CrossRef](#)]
3. Marr, C. Thoracic Ultrasonography. *Equine Vet. Educ.* **1993**, *5*, 41–46. [[CrossRef](#)]
4. Barrett, M.; Park, R. Review of Radiographic Technique and Interpretation of the Equine Skull. *AAEP Proc.* **2011**, *57*, 431–437.
5. Gibbs, C.; Lane, J.G. Radiographic Examination of the Facial, Nasal and Paranasal Sinus Regions of the Horse. II. Radiological Findings. *Equine Vet. J.* **1987**, *19*, 474–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Koblinger, K.; Nicol, J.; McDonald, K.; Wasko, A.; Logie, N.; Weiss, M.; Léguillette, R. Endoscopic Assessment of Airway Inflammation in Horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2011**, *25*, 1118–1126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Barakzai, S.Z.; Dixon, P.M. Correlation of Resting and Exercising Endoscopic Findings for Horses with Dynamic Laryngeal Collapse and Palatal Dysfunction. *Equine Vet. J.* **2011**, *43*, 18–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



8. Kraft, S.L.; Gavin, P. Physical Principles and Technical Considerations for Equine Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2001**, *17*, 115–130. [\[CrossRef\]](#)
9. Kutasi, O.; Balogh, N.; Lajos, Z.; Nagy, K.; Szenci, O. Diagnostic Approaches for the Assessment of Equine Chronic Pulmonary Disorders. *J. Equine Vet. Sci.* **2011**, *31*, 400–410. [\[CrossRef\]](#)
10. Lo Feudo, C.M.; Stucchi, L.; Alberti, E.; Stancari, G.; Conturba, B.; Zucca, E.; Ferrucci, F. The Role of Thoracic Ultrasonography and Airway Endoscopy in the Diagnosis of Equine Asthma and Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage. *Vet. Sci.* **2021**, *8*, 276. [\[CrossRef\]](#)
11. Reef, V.B.; Whittier, M.; Allam, L.G. Thoracic Ultrasonography. *Clin. Tech. Equine Pract.* **2004**, *3*, 284–293. [\[CrossRef\]](#)
12. Raphel, C.F. Endoscopic Findings in the Upper Respiratory Tract of 479 Horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1982**, *181*, 470–473.
13. Hardy, J.; Léveillé, R. Diseases of the Guttural Pouches. *Vet. Clin. Equine Pract.* **2003**, *19*, 123–158. [\[CrossRef\]](#)
14. Couëtil, L.L.; Gallatin, L.L.; Blevins, W.; Khadra, I. Treatment of Tracheal Collapse with an Intraluminal Stent in a Miniature Horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2004**, *225*, 1727–1732. [\[CrossRef\]](#)
15. Couetil, L.; Cardwell, J.M.; Leguillette, R.; Mazan, M.; Richard, E.; Bienzle, D.; Bullone, M.; Gerber, V.; Ivester, K.; Lavoie, J.-P.; et al. Equine Asthma: Current Understanding and Future Directions. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 450. [\[CrossRef\]](#)
16. Perkins, G.A.; Viel, L.; Wagner, B.; Hoffman, A.; Erb, H.N.; Ainsworth, D.M. Histamine Bronchoprovocation Does Not Affect Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytology, Gene Expression and Protein Concentrations of IL-4, IL-8 and IFN-Gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2008**, *126*, 230–235. [\[CrossRef\]](#)
17. Hathcock, J.T.; Stickle, R.L. Principles and Concepts of Computed Tomography. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **1993**, *23*, 399–415. [\[CrossRef\]](#)
18. Dakin, S.G.; Lam, R.; Rees, E.; Mumby, C.; West, C.; Weller, R. Technical Set-up and Radiation Exposure for Standing Computed Tomography of the Equine Head: Standing CT of the Equine Head. *Equine Vet. Educ.* **2014**, *26*, 208–215. [\[CrossRef\]](#)
19. Tucker, R.L.; Farrell, E. Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging of the Equine Head. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2001**, *17*, 131–144. [\[CrossRef\]](#)
20. Schliewert, E.-C.; Lascola, K.M.; O'Brien, R.T.; Clark-Price, S.C.; Wilkins, P.A.; Foreman, J.H.; Mitchell, M.A.; Hartman, S.K.; Kline, K.H. Comparison of Radiographic and Computed Tomographic Images of the Lungs in Healthy Neonatal Foals. *Am. J. Vet. Res.* **2015**, *76*, 42–52. [\[CrossRef\]](#)
21. Farrow, C.S. The Equine Skull: Dealing Successfully with Radiographic Complexity. In *Veterinary Diagnostic Imaging: The Horse*; Farrow, C.S., Ed.; Mosby: Saint Louis, MO, USA, 2006; Chapter 18; pp. 329–332. ISBN 978-0-323-01206-5.
22. Crijns, C.P.; Baeumlin, Y.; De Rycke, L.; Broeckx, B.J.G.; Vlamincx, L.; Bergman, E.H.J.; van Bree, H.; Gielen, I. Intra-Arterial versus Intra Venous Contrast-Enhanced Computed Tomography of the Equine Head. *BMC Vet. Res.* **2016**, *12*, 6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Barbee, D.D.; Allen, J.R.; Gavin, P.R. Computed tomography in horses: Technique. *Vet. Radiol.* **1987**, *28*, 144–151. [\[CrossRef\]](#)
24. Solano, M.; Brawer, R.S. CT of the Equine Head: Technical Considerations, Anatomical Guide, and Selected Diseases. *Clin. Tech. Equine Pract.* **2004**, *3*, 374–388. [\[CrossRef\]](#)
25. Esmaeili, F.; Johari, M.; Haddadi, P.; Vatankhah, M. Beam Hardening Artifacts: Comparison between Two Cone Beam Computed Tomography Scanners. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospect.* **2012**, *6*, 49–53. [\[CrossRef\]](#)
26. Witte, T.H.; Perkins, J.D. Early Diagnosis May Hold the Key to the Successful Treatment of Nasal and Paranasal Sinus Neoplasia in the Horse. *Equine Vet. Educ.* **2011**, *23*, 441–447. [\[CrossRef\]](#)
27. Zakia, L.; Shaw, S.; Bonomelli, N.; O'Sullivan, S.; Zur Linden, A.; Dubois, M.; Baird, J.; Guest, B. Hematuria in a 3-Month-Old Filly with an Internal Umbilical Abscess and Internal Iliac Artery Aneurysm. *Can. Vet. J.* **2021**, *62*, 877–881.
28. Strohmayer, C.; Klang, A.; Kneissl, S. Computed Tomographic and Histopathological Characteristics of 13 Equine and 10 Feline Oral and Sinonasal Squamous Cell Carcinomas. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 591437. [\[CrossRef\]](#)
29. Cilliers, I.; Williams, J.; Carstens, A.; Duncan, N.M. Three Cases of Osteoma and an Osseous Fibroma of the Paranasal Sinuses of Horses in South Africa: Clinical Communication. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **2008**, *79*, 185–193. [\[CrossRef\]](#)
30. De Zani, D.; Zani, D.D.; Borgonovo, S.; Di Giancamillo, M.; Rondena, M.; Verschooten, F. An Undifferentiated Sarcoma in the Cervical Region in a Horse: Undifferentiated Cervical Sarcoma in a Horse. *Equine Vet. Educ.* **2011**, *23*, 138–141. [\[CrossRef\]](#)
31. Cissell, D.D.; Wisner, E.R.; Textor, J.; Mohr, F.C.; Scrivani, P.V.; Théon, A.P. Computed Tomographic Appearance of Equine Sinonasal Neoplasia. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2012**, *53*, 245–251. [\[CrossRef\]](#)
32. Henninger, W.; Mairi Frame, E.; Willmann, M.; Simhofer, H.; Malleczek, D.; Kneissl, S.M.; Mayrhofer, E. CT Features of alveolitis and sinusitis in horses. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2003**, *44*, 269–276. [\[CrossRef\]](#)
33. Fenner, M.F.; Verwilghen, D.; Townsend, N.; Simhofer, H.; Schwarzer, J.; Zani, D.D.; Bienert-Zeit, A. Paranasal Sinus Cysts in the Horse: Complications Related to Their Presence and Surgical Treatment in 37 Cases. *Equine Vet. J.* **2019**, *51*, 57–63. [\[CrossRef\]](#)
34. Annear, M.J.; Gemensky-Metzler, A.J.; Elce, Y.A.; Stone, S.G. Exophthalmus Secondary to a Sinonasal Cyst in a Horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2008**, *15*, 233–285. [\[CrossRef\]](#)
35. Ostrowska, J.; Lindström, L.; Tóth, T.; Hansson, K.; Uhlhorn, M.; Ley, C.J. Computed Tomography Characteristics of Equine Paranasal Sinus Cysts. *Equine Vet. J.* **2020**, *52*, 538–546. [\[CrossRef\]](#)
36. Hilton, H.; Puchalski, S.M.; Aleman, M. The Computed Tomographic Appearance of Equine Temporohyoid Osteoarthropathy. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2009**, *50*, 151–156. [\[CrossRef\]](#)
37. Divers, T.J.; Ducharme, N.G.; de Lahunta, A.; Irby, N.L.; Scrivani, P.V. Temporohyoid Osteoarthropathy. *Clin. Tech. Equine Pract.* **2006**, *5*, 17–23. [\[CrossRef\]](#)

38. Bras, J.J.; Davis, E.; Beard, W.L. Bilateral Ceratohyoidectomy for the Resolution of Clinical Signs Associated with Temporohyoid Osteoarthropathy. *Equine Vet. Educ.* **2014**, *26*, 116–120. [\[CrossRef\]](#)
39. Kowalczyk, L.; Boehler, A.; Brunthaler, R.; Rathmanner, M.; Rijkenhuizen, A.B.M. Squamous Cell Carcinoma of the Paranasal Sinuses in Two Horses. *Equine Vet. Educ.* **2011**, *23*, 435–440. [\[CrossRef\]](#)
40. Dixon, P.M.; Barnett, T.P.; Morgan, R.E.; Reardon, R.J.M. Computed Tomographic Assessment of Individual Paranasal Sinus Compartment and Nasal Conchal Bulla Involvement in 300 Cases of Equine Sinonasal Disease. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 797. [\[CrossRef\]](#)
41. Sogaro-Robinson, C.; Lacombe, V.A.; Reed, S.M.; Balkrishnan, R. Factors Predictive of Abnormal Results for Computed Tomography of the Head in Horses Affected by Neurologic Disorders: 57 Cases (2001–2007). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2009**, *235*, 176–183. [\[CrossRef\]](#)
42. Manso-Díaz, G.; García-López, J.M.; Maranda, L.; Taeymans, O. The Role of Head Computed Tomography in Equine Practice. *Equine Vet. Educ.* **2015**, *27*, 136–145. [\[CrossRef\]](#)
43. Garrett, K.S.; Woodie, J.B.; Cook, J.L.; Williams, N.M. Imaging Diagnosis—Nasal Septal and Laryngeal Cyst-like Malformations in a Thoroughbred Weanling Colt Diagnosed Using Ultrasonography and Magnetic Resonance Imaging. *Vet. Radiol. Ultrasound Off. J. Am. Coll. Vet. Radiol. Int. Vet. Radiol. Assoc.* **2010**, *51*, 504–507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Murray, R.C. *Equine MRI*, 1st ed.; John Wiley & Sons, Ltd.: Hoboken, NJ, USA, 2010; pp. 249–267.
45. Fitz, J.; Gerhards, H. Magnetic Resonance Imaging of the Thorax and Abdomen in Foals. *Pferdeheilkunde* **2005**, *21*, 115–123. [\[CrossRef\]](#)
46. Gutierrez-Nibeyro, S.D.; Werpy, N.M.; Gold, S.J.; Olguin, S.; Schaeffer, D.J. Standing MRI Lesions of the Distal Interphalangeal Joint and Podotrochlear Apparatus Occur with a High Frequency in Warmblood Horses. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2020**, *61*, 336–345. [\[CrossRef\]](#)
47. Werpy, N.M. Magnetic Resonance Imaging of the Equine Patient: A Comparison of High- and Low-Field Systems. *Clin. Tech. Equine Pract.* **2007**, *6*, 37–45. [\[CrossRef\]](#)
48. Hatabu, H.; Ohno, Y.; Geftter, W.B.; Parraga, G.; Madore, B.; Lee, K.S.; Altes, T.A.; Lynch, D.A.; Mayo, J.R.; Seo, J.B.; et al. Expanding Applications of Pulmonary MRI in the Clinical Evaluation of Lung Disorders: Fleischner Society Position Paper. *Radiology* **2020**, *297*, 286–301. [\[CrossRef\]](#)
49. Zani, D.D.; Rabbogliatti, V.; Ravasio, G.; Pettinato, C.; Giancamillo, M.D.; Zani, D.D. Contrast Enhanced Magnetic Resonance Imaging of the Foot in Horses Using Intravenous versus Regional Intraarterial Injection of Gadolinium. *Open Vet. J.* **2018**, *8*, 471–478. [\[CrossRef\]](#)
50. Waselau, M.; McKnight, A.; Kasparek, A. Magnetic Resonance Imaging of Equine Stifles: Technique and Observations in 76 Clinical Cases. *Equine Vet. Educ.* **2020**, *32*, 85–91. [\[CrossRef\]](#)
51. Barrett, M.F.; Selberg, K.T.; Johnson, S.A.; Hersman, J.; Frisbie, D.D. High Field Magnetic Resonance Imaging Contributes to Diagnosis of Equine Distal Tarsus and Proximal Metatarsus Lesions: 103 Horses. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2018**, *59*, 587–596. [\[CrossRef\]](#)
52. Ferrell, E.A.; Gavin, P.R.; Tucker, R.L.; Sellon, D.C.; Hikes, M.T. Magnetic Resonance for Evaluation of Neurologic Disease in 12 Horses. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2002**, *43*, 510–516. [\[CrossRef\]](#)
53. Spoormakers, T.J.P.; Ensink, J.M.; Goehring, L.S.; Koeman, J.P.; Braake, F.T.; van der Vlugt-Meijer, R.H.; van der Belt, A.J.M. Brain Abscesses as a Metastatic Manifestation of Strangles: Symptomatology and the Use of Magnetic Resonance Imaging as a Diagnostic Aid. *Equine Vet. J.* **2010**, *35*, 146–151. [\[CrossRef\]](#)
54. Tessier, C.; Brühshwein, A.; Lang, J.; Konar, M.; Wilke, M.; Brehm, W.; Kircher, P. Magnetic Resonance Imaging Features of Sinonasal Disorders in Horses. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2013**, *54*, 54–60. [\[CrossRef\]](#)
55. Garrett, K.S.; Woodie, J.B.; Embertson, R.M.; Pease, A.P. Diagnosis of Laryngeal Dysplasia in Five Horses Using Magnetic Resonance Imaging and Ultrasonography. *Equine Vet. J.* **2009**, *41*, 766–771. [\[CrossRef\]](#)
56. Garrett, K.S. Advances in Diagnostic Imaging of the Larynx and Pharynx. *Equine Vet. Educ.* **2012**, *24*, 17–18. [\[CrossRef\]](#)
57. Rieger, C.; Herzog, P.; Eibel, R.; Fiegl, M.; Ostermann, H. Pulmonary MRI—a New Approach for the Evaluation of Febrile Neutropenic Patients with Malignancies. *Support. Care Cancer* **2008**, *16*, 599–606. [\[CrossRef\]](#)
58. Syrjala, H.; Broas, M.; Ohtonen, P.; Jartti, A.; Pääkkö, E. Chest Magnetic Resonance Imaging for Pneumonia Diagnosis in Outpatients with Lower Respiratory Tract Infection. *Eur. Respir. J.* **2017**, *49*, 1601303. [\[CrossRef\]](#)
59. Eibel, R.; Herzog, P.; Dietrich, O.; Rieger, C.T.; Ostermann, H.; Reiser, M.F.; Schoenberg, S.O. Pulmonary Abnormalities in Immunocompromised Patients: Comparative Detection with Parallel Acquisition MR Imaging and Thin-Section Helical CT. *Radiology* **2006**, *241*, 880–891. [\[CrossRef\]](#)
60. Couetil, L.L.; Rosenthal, F.S.; DeNicola, D.B.; Chilcoat, C.D. Clinical Signs, Evaluation of Bronchoalveolar Lavage Fluid, and Assessment of Pulmonary Function in Horses with Inflammatory Respiratory Disease. *Am. J. Vet. Res.* **2001**, *62*, 538–546. [\[CrossRef\]](#)
61. Butler, P.J.; Woakes, A.J.; Smale, K.; Roberts, C.A.; Hillidge, C.J.; Snow, D.H.; Marlin, D.J. Respiratory and Cardiovascular Adjustments during Exercise of Increasing Intensity and during Recovery in Thoroughbred Racehorses. *J. Exp. Biol.* **1993**, *179*, 159–180. [\[CrossRef\]](#)
62. Hyatt, R.E.; Scanlon, P.D.; Nakamura, M. *Interpretation of Pulmonary Function Tests*; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2014; ISBN 978-1-4511-4380-5.

63. Hoffman, A.M. Clinical Application of Pulmonary Function Testing in Horses. Available online: <https://www.ivis.org/library/equine-respiratory-diseases/clinical-application-of-pulmonary-function-testing-horses> (accessed on 20 December 2021).
64. Burnheim, K.; Hughes, K.J.; Evans, D.L.; Raidal, S.L. Reliability of Breath by Breath Spirometry and Relative Flow-Time Indices for Pulmonary Function Testing in Horses. *BMC Vet. Res.* **2016**, *12*, 268. [CrossRef]
65. Herteman, N.; Mosing, M.; Waldmann, A.; Gerber, V.; Schoster, A. Exercise-induced Airflow Changes in Horses with Asthma Measured by Electrical Impedance Tomography. *J. Vet. Intern. Med.* **2021**, *35*, 2500–2510. [CrossRef]
66. Erck, E.; Votion, D.; Art, T.; Lekeux, P. Measurement of Respiratory Function by Impulse Oscillometry in Horses. *Equine Vet. J.* **2010**, *36*, 21–28. [CrossRef]
67. Moens, Y.P.S. Clinical Application of Continuous Spirometry with a Pitot-Based Flow Meter during Equine Anaesthesia. *Equine Vet. Educ.* **2010**, *22*, 354–360. [CrossRef]
68. Evans, D.L.; Kiddell, L.; Smith, C.L. Pulmonary Function Measurements Immediately after Exercise Are Correlated with Neutrophil Percentage in Tracheal Aspirates in Horses with Poor Racing Performance. *Res. Vet. Sci.* **2011**, *90*, 510–515. [CrossRef]
69. Herholz, C.; Straub, R.; Braendlin, C.; Imhof, A.; Lüthi, S.; Busato, A. Measurement of Tidal Breathing Flow-Volume Loop Indices in Horses Used for Different Sporting Purposes with and without Recurrent Airway Obstruction. *Vet. Rec.* **2003**, *152*, 288–292. [CrossRef]
70. Raidal, S.L.; Burnheim, K.; Evans, D.; Hughes, K.J. Effects of Sedation and Salbutamol Administration on Hyperpnoea and Tidal Breathing Spirometry in Healthy Horses. *Vet. J.* **2017**, *222*, 22–28. [CrossRef] [PubMed]
71. Mosing, M.; Marly-Voquer, C.; Macfarlane, P.; Bardell, D.; Bohm, S.; Bettschart-Wolfensberger, R.; Waldmann, A. Regional Distribution of Ventilation in Horses in Dorsal Recumbency during Spontaneous and Mechanical Ventilation Assessed by Electrical Impedance Tomography: A Case Series. *Vet. Anaesth. Analg.* **2016**, *44*, 127–132. [CrossRef] [PubMed]
72. Ambrisko, T.D.; Schramel, J.P.; Adler, A.; Kutasi, O.; Makra, Z.; Moens, Y.P.S. Assessment of Distribution of Ventilation by Electrical Impedance Tomography in Standing Horses. *Physiol. Meas.* **2015**, *37*, 175–186. [CrossRef] [PubMed]
73. Secombe, C.; Adler, A.; Hosgood, G.; Rasis, A.; Mosing, M. Can Bronchoconstriction and Bronchodilatation in Horses Be Detected Using Electrical Impedance Tomography? *J. Vet. Intern. Med.* **2021**, *35*, 2035–2044. [CrossRef] [PubMed]
74. Van Erck, E.; Votion, D.M.; Kirschvink, N.; Art, T.; Lekeux, P. Use of the Impulse Oscillometry System for Testing Pulmonary Function during Methacholine Bronchoprovocation in Horses. *Am. J. Vet. Res.* **2003**, *64*, 1414–1420. [CrossRef]
75. Van Erck, E.; Votion, D.; Kirschvink, N.; Genicot, B.; Lindsey, J.; Art, T.; Lekeux, P. Influence of Breathing Pattern and Lung Inflation on Impulse Oscillometry Measurements in Horses. *Vet. J.* **2004**, *168*, 259–269. [CrossRef]
76. Klein, C.; Smith, H.-J.; Reinhold, P. The Use of Impulse Oscillometry for Separate Analysis of Inspiratory and Expiratory Impedance Parameters in Horses: Effects of Sedation with Xylazine. *Res. Vet. Sci.* **2006**, *80*, 201–208. [CrossRef]
77. Stucchi, L.; Ferrucci, F.; Bullone, M.; Dellacà, R.L.; Lavoie, J.P. Within-Breath Oscillatory Mechanics in Horses Affected by Severe Equine Asthma in Exacerbation and in Remission of the Disease. *Animals* **2022**, *12*, 4. [CrossRef]
78. Vogelmeier, C.F.; Criner, G.J.; Martinez, F.J.; Anzueto, A.; Barnes, P.J.; Bourbeau, J.; Celli, B.R.; Chen, R.; Decramer, M.; Fabbrì, L.M.; et al. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2017**, *195*, 557–582. [CrossRef]
79. Moore, V.C. Spirometry: Step by Step. *Breathe* **2012**, *8*, 232–240. [CrossRef]
80. Leith, D.E. Comparative Mammalian Respiratory Mechanics. *Physiologist* **1976**, *19*, 485–510.
81. Jat, K.R. Spirometry in Children. *Prim. Care Respir. J.* **2013**, *22*, 221–229. [CrossRef]
82. Guthrie, A.J.; Beadle, R.E.; Bateman, R.D.; White, C.E. Characterization of Normal Tidal Breathing Flow-Volume Loops for Thoroughbred Horses. *Vet. Res. Commun.* **1995**, *19*, 331–342. [CrossRef]
83. Art, T.; Lekeux, P. Respiratory Airflow Patterns in Ponies at Rest and during Exercise. *Can. J. Vet. Res.* **1988**, *52*, 299–303.
84. Connally, B.A.; Derksen, F.J. Tidal Breathing Flow-Volume Loop Analysis as a Test of Pulmonary Function in Exercising Horses. *Am. J. Vet. Res.* **1994**, *55*, 589–594.
85. Petsche, V.M.; Derksen, F.J.; Robinson, N.E. Tidal Breathing Flow-Volume Loops in Horses with Recurrent Airway Obstruction (Heaves). *Am. J. Vet. Res.* **1994**, *55*, 885–891.
86. Mazan, M.R.; Hoffman, A.M. Effects of Aerosolized Albuterol on Physiologic Responses to Exercise in Standardbreds. *Am. J. Vet. Res.* **2001**, *62*, 1812–1817. [CrossRef]
87. Frerichs, I.; Amato, M.B.P.; van Kaam, A.H.; Tingay, D.G.; Zhao, Z.; Grychtol, B.; Bodenstein, M.; Gagnon, H.; Böhm, S.H.; Teschner, E.; et al. Chest Electrical Impedance Tomography Examination, Data Analysis, Terminology, Clinical Use and Recommendations: Consensus Statement of the TRanslational EIT DevelopmeNt StuDY Group. *Thorax* **2017**, *72*, 83–93. [CrossRef]
88. Wang, Y.-M.; Sun, X.-M.; Zhou, Y.-M.; Chen, J.-R.; Cheng, K.-M.; Li, H.-L.; Yang, Y.-L.; Zhang, L.; Zhou, J.-X. Use of Electrical Impedance Tomography (EIT) to Estimate Global and Regional Lung Recruitment Volume (VREC) Induced by Positive End-Expiratory Pressure (PEEP): An Experiment in Pigs with Lung Injury. *Med. Sci. Monit.* **2020**, *26*, e922609. [CrossRef]
89. Dijkstra, A.M.; Brown, B.H.; Leathard, A.D.; Harris, N.D.; Barber, D.C.; Edbrooke, D.L. Review Clinical Applications of Electrical Impedance Tomography. *J. Med. Eng. Technol.* **1993**, *17*, 89–98. [CrossRef]
90. Secombe, C.; Waldmann, A.; Hosgood, G.; Mosing, M. Evaluation of Histamine-provoked Changes in Airflow Using Electrical Impedance Tomography in Horses. *Equine Vet. J.* **2019**, *52*, 556–563. [CrossRef]

91. Wey, C.; Meira, C.; Mosing, M.; Bleul, U. Development of the Postnatal Lung in Bovine Neonates Illustrated by Electrical Impedance Tomography (EIT). In Proceedings of the Conference: Workshop on Gonadal Function, Gamete Interaction and Pregnancy (GGP), Giessen, Germany, 30 October 2017.
92. Ambrisko, T.; Schramel, J.; Auer, U.; Moens, Y.; Staffieri, F. Impact of Four Different Recumbencies on the Distribution of Ventilation in Conscious or Anaesthetized Spontaneously Breathing Beagle Dogs: An Electrical Impedance Tomography Study. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183340. [[CrossRef](#)]
93. Moens, Y.; Schramel, J.; Tusman, G.; Ambrisko, T.; Solà, J.; Brunner, J.; Kowalczyk, L.; Böhm, S. Variety of Non-Invasive Continuous Monitoring Methodologies Including Electrical Impedance Tomography Provides Novel Insights into the Physiology of Lung Collapse and Recruitment—Case Report of an Anaesthetized Horse. *Vet. Anaesth. Analg.* **2013**, *41*, 196–204. [[CrossRef](#)]
94. Mosing, M.; Sacks, M.; Tahas, S.; Ranninger, E.; Bohm, S.; Campagna, I.; Waldmann, A. Ventilatory Incidents Monitored by Electrical Impedance Tomography in an Anaesthetized Orangutan (*Pongo Abellii*). *Vet. Anaesth. Analg.* **2017**, *44*, 973–976. [[CrossRef](#)]
95. Schramel, J.; Nagel, C.; Auer, U.; Palm, F.; Aurich, C.; Moens, Y. Distribution of Ventilation in Pregnant Shetland Ponies Measured by Electrical Impedance Tomography. *Respir. Physiol. Neurobiol.* **2012**, *180*, 258–262. [[CrossRef](#)]
96. Milne, S.; Huvanandana, J.; Nguyen, C.; Duncan, J.M.; Chapman, D.G.; Tonga, K.O.; Zimmermann, S.C.; Slattery, A.; King, G.G.; Thamrin, C. Time-Based Pulmonary Features from Electrical Impedance Tomography Demonstrate Ventilation Heterogeneity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *J. Appl. Physiol.* **2019**, *127*, 1441–1452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Mosing, M.; Waldmann, A.; Macfarlane, P.; Iff, S.; Auer, U.; Bohm, S.; Bettschart-Wolfensberger, R.; Bardell, D. Horses Auto-Recruit Their Lungs by Inspiratory Breath Holding Following Recovery from General Anaesthesia. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158080. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Auer, U.; Schramel, J.; Moens, Y.; Mosing, M.; Braun, C. Monitoring Changes in Distribution of Pulmonary Ventilation by Functional Electrical Impedance Tomography in Anaesthetized Ponies. *Vet. Anaesth. Analg.* **2018**, *46*, 200–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Wettstein, D.; Moens, Y.; Jaegglin-Schmucker, N.; Böhm, S.H.; Rothen, H.U.; Mosing, M.; Kästner, S.B.R.; Schatzmann, U. Effects of an Alveolar Recruitment Maneuver on Cardiovascular and Respiratory Parameters during Total Intravenous Anesthesia in Ponies. *Am. J. Vet. Res.* **2006**, *67*, 152–159. [[CrossRef](#)]
100. Mosing, M.; Auer, U.; Macfarlane, P.; Bardell, D.; Schramel, J.; Bohm, S.; Bettschart-Wolfensberger, R.; Waldmann, A. Regional Ventilation Distribution and Dead Space in Anaesthetised Horses Treated with and without Continuous Positive Airway Pressure (CPAP). *Vet. Anaesth. Analg.* **2017**, *45*, 31–40. [[CrossRef](#)]
101. Balleza, M.; Casan, P.; Riu, P.J. Tidal Volume Monitoring with Electrical Impedance Tomography (EIT) on COPD Patients. Relationship Between EIT and Diffusion Lung Transfer (DL<sub>CO</sub>). In *Proceedings of the World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, Munich, Germany, 7–12 September 2009*; Dössel, O., Schlegel, W.C., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; pp. 549–552.
102. Vogt, B.; Pulletz, S.; Elke, G.; Zhao, Z.; Zabel, P.; Weiler, N.; Frerichs, I. Spatial and Temporal Heterogeneity of Regional Lung Ventilation Determined by Electrical Impedance Tomography during Pulmonary Function Testing. *J. Appl. Physiol.* **2012**, *113*, 1154–1161. [[CrossRef](#)]
103. Leclere, M.; Lavoie-Lamoureux, A.; Lavoie, J.-P. Heaves, an Asthma-like Disease of Horses. *Respirology* **2011**, *16*, 1027–1046. [[CrossRef](#)]
104. Komarow, H.D.; Myles, I.A.; Uzzaman, A.; Metcalfe, D.D. Impulse Oscillometry in the Evaluation of Diseases of the Airways in Children. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **2011**, *106*, 191–199. [[CrossRef](#)]
105. Richard, E.A.; Fortier, G.D.; Denoix, J.-M.; Art, T.; Lekeux, P.M.; Erck, E. van Influence of Subclinical Inflammatory Airway Disease on Equine Respiratory Function Evaluated by Impulse Oscillometry. *Equine Vet. J.* **2009**, *41*, 384–389. [[CrossRef](#)]
106. Koulouris, N.G.; Hardavella, G. Physiological Techniques for Detecting Expiratory Flow Limitation during Tidal Breathing. *Eur. Respir. Rev.* **2011**, *20*, 147–155. [[CrossRef](#)]



## **Oświadczenia współautorów publikacji [P.1]**



Warszawa, 02.09.2025 r.

lek. wet. Natalia Kozłowska  
natalia\_kozłowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2022) Advances in the Diagnosis of Equine Respiratory Diseases: A Review of Novel Imaging and Functional Techniques. Animals, 12(3), 381* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metody badawczej, udziale w przygotowaniu szkicu manuskryptu oraz udziale w przygotowaniu wizualizacji.

  
(Podpis)

Warszawa, 02.09.2025 r.

Dr Małgorzata Wierzbicka  
malgorzata\_wierzbicka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2022) Advances in the Diagnosis of Equine Respiratory Diseases: A Review of Novel Imaging and Functional Techniques*. *Animals*, 12(3), 381 mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w zapewnieniu zasobów do realizacji badań, udziale w nadzorze nad powstawaniem pracy oraz udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu.

.....  
(Podpis)

Warszawa, 02.09.2025 r.

Dr Tomasz Jasiński  
tomasz\_jasinski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2022) Advances in the Diagnosis of Equine Respiratory Diseases: A Review of Novel Imaging and Functional Techniques. Animals, 12(3), 381* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w zapewnieniu zasobów do realizacji badań oraz udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu.

.....  
(Podpis)

Warszawa, 02.09.2025 r.

Dr hab. Małgorzata Domino, prof. uczelni  
malgorzata\_domino@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2022) Advances in the Diagnosis of Equine Respiratory Diseases: A Review of Novel Imaging and Functional Techniques*. *Animals*, 12(3), 381 mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metody badawczej, udziale w przygotowaniu szkicu manuskryptu, udziale w przygotowaniu wizualizacji oraz udziale w nadzorze nad pracą zespołu.



(Podpis)

## Article

# Co-Occurrence of Severe Equine Asthma and Palatal Disorders in Privately Owned Pleasure Horses

Natalia Kozłowska \* , Małgorzata Wierzbicka, Bartosz Pawliński  and Małgorzata Domino \* 

Department of Large Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; malgorzata\_wierzbicka@sggw.edu.pl (M.W.); bartosz\_pawlinski@sggw.edu.pl (B.P.)

\* Correspondence: natalia\_kozlowska@sggw.edu.pl (N.K.); malgorzata\_domino@sggw.edu.pl (M.D.); Tel.: +48-532151876 (N.K.)

**Simple Summary:** Asthma is one of the leading problems affecting the lower airways in equids. At the same time, palatal disorders, including primary palatal instability and dorsal displacement of the soft palate, are common problems affecting the equine upper airways. In human medicine, “one airway, one disease” is a widely accepted concept describing the anatomical, physiological, and immunological connections between upper and lower airways. Clinical studies have already highlighted co-occurrences and associations between lower airway diseases, such as asthma, and upper airway diseases, such as rhinitis, rhinosinusitis, vocal cord dysfunction, or obstructing sleep apnea in people. However, only a few studies have explored co-occurrences and associations between asthma and palatal disorder in horses. This study aimed to investigate the occurrence of palatal disorders in horses affected by severe asthma in exacerbation and to assess whether a decrease can be observed after treatment-induced disease remission. The presence of palatal disorders was investigated by overground endoscopy in forty-six horses diagnosed with severe equine asthma before and after asthma treatment. Palatal disorders were diagnosed less frequently in remission after asthma treatment than during exacerbation before treatment, suggesting that both asthma and palatal disorders may respond to similar treatment plans.



**Citation:** Kozłowska, N.; Wierzbicka, M.; Pawliński, B.; Domino, M. Co-Occurrence of Severe Equine Asthma and Palatal Disorders in Privately Owned Pleasure Horses. *Animals* **2023**, *13*, 1962. <https://doi.org/10.3390/ani13121962>

Academic Editors: Joana Simões, Paula Tilley and Cátia Marques

Received: 1 April 2023

Revised: 4 June 2023

Accepted: 8 June 2023

Published: 12 June 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** According to the “unified or united airway disease” theory, diseases in the upper and lower airways frequently co-occur because they represent a single morphological and functional unit. Palatal disorders (PDs) and severe equine asthma (SEA) are frequent diseases that, respectively, affect upper and lower equine airways; however, clinical studies focusing on the co-occurrence of PDs and SEA are limited. The present study investigated the prevalence of PDs in horses affected by SEA, and whether prevalence decreased after SEA treatment. Forty-six privately owned horses affected by SEA in exacerbation were included. For each horse, the severity of the asthma clinical signs was assessed using a previously described scoring system, and the co-occurrence of palatal disorders was investigated using overground endoscopy, before and after treatment for SEA. Before treatment (in exacerbation), 67.4% of SEA-affected horses showed evidence of PDs, including 39.1% showing evidence of palatal instability (PI) and 28.3% of dorsal displacement of the soft palate (DDSP). Airway inflammation (neutrophil percentage in the tracheal wash and bronchoalveolar lavage fluid) was worse in horses with co-occurring PDs. After treatment (in remission), no horses showed evidence of PI, while DDSP was diagnosed in 8.7% of horses. These findings suggest that palatal disorders respond to asthma treatment, supporting the hypothesis that both diseases could be manifestation of a common underlying disorder.

**Keywords:** equine asthma; palatal instability; dorsal displacement of soft palate; airway diseases; equids

## 1. Introduction

Equine asthma (EA) is a disorder characterized by mild to severe chronic lower airway inflammation affecting horses of all ages and types. This disease represents a significant

cause of poor performance, quality-of-life impairment, and an increase in the costs of veterinary healthcare in the equine industry [1]. The etiology is still under investigation, as the disease results from a complex interaction between genetic and environmental factors [2]. In addition to chronic airway inflammation, reversible bronchospasm and progressive airway remodeling represent pathophysiological hallmarks of the disease. The most severe form (severe equine asthma, SEA), which affects approximately 14–17% of the horse population, is clinically characterized by recurrent episodes of evident expiratory dyspnea, alternating with periods of disease remission [1,3]. The disease can be presumptively diagnosed based on history and physical examination. However, definitive confirmation requires a demonstration of ongoing lower airway obstruction through pulmonary function testing (PFT), and ongoing lower airway inflammation through airway endoscopy and broncho-alveolar lavage fluid (BALf) cytology [2,4]. While the use of endoscopy and BALf cytology is a widespread practice, PFT use remains mostly limited to research centers and is not available to several institutions [5]. Severe equine asthma is an incurable disease; however, long-term therapeutic management can help to reduce the frequency of clinical episode relapses. Bronchodilator and corticosteroid medications are used to effectively control symptoms during clinical episodes. However, successful long-term treatment strategies require implementation of various environmental interventions that aim to reduce exposure to dust and other airborne exacerbating factors [6,7].

Upper airway disorders are also common in the equine population, and include palatal disorders (PD) such as palatal instability (PI) and dorsal displacement of the soft palate (DDSP). The highest PDs prevalence occurs in the overall population of Thoroughbred and Standardbred racehorses. PDs are also common in horses working with a flexed neck, such as dressage horses and Saddlebreds [8,9]. Although a high correlation between the prevalence of PI and DDSP has been reported, it should be observed that PI often progresses to DDSP, while DDSP may occur in the absence of PI [8]. Possible etiological contributing factors include nerve (pharyngeal branch of the vagus nerve, hypoglossal nerve) or thyrohyoid muscle dysfunction [10–12] and congenital or acquired anatomical aberrations (epiglottic malformation, cysts, masses) [13]. Moreover, some clinical evidence suggests that local inflammation of the nasopharyngeal region may predispose individuals to obstructive upper airway diseases, such as nasopharyngeal collapse, aryepiglottic fold collapse, and dorsal displacement of the soft palate [10,13–15]. Clinical signs of PDs include poor athletic performance, abnormal respiratory noise, and coughing during exercise, and definite diagnosis is based on dynamic endoscopic examination (overground or high-speed treadmill endoscopy) [14,16–18].

In human medicine, the concept of “Unified or United Airway Disease” (UAD) or “One Airway, One Disease” has recently acquired significant clinical importance in the diagnostic and therapeutic approaches to asthma [19,20]. The evidence of co-occurring asthma and upper airway diseases, including rhinitis [21], chronic rhinosinusitis [22], obstructive sleep apnea [23], and vocal cord dysfunction [24], supports the hypothesis that common pathophysiological factors could underlie both disease processes, requiring integrated diagnostic and treatment approaches. Epidemiological evidence supports the finding that approximately 80% of asthmatics had rhinitis, and roughly 30% of patients with rhinitis had asthma [25]. One may note that in humans, the inflammatory infiltrates in the nasal and bronchial mucosa have a similar cellular composition. Thus, similar mechanisms involved in allergy development related to anatomical continuity may be suggested. Gaga et al. found, in nasal mucosa biopsies of asthmatic people, the presence of cellular infiltration even in the absence of signs of rhinitis [26]. This finding supports the hypothesis that HA and rhinitis are clinical expressions of the same disease. Moreover, in asthmatic people, a high prevalence of obstructive sleep apnea was found, caused by the permanent mucosal inflammation of the soft palate [23,26]. Even though human asthma and EA share several clinical and pathophysiological similarities, the UAD concept in equine medicine has not been thoroughly explored [3,27]. Interestingly, recent research by Joó et al. [28] has highlighted a high prevalence of DDSP in horses with EA, and particularly



with SEA in exacerbation. Further investigation is worthwhile, considering the high clinical impact that both SEA and PDs have on equine health, and in particular there is a need to evaluate which factors are associated with an increased or decreased prevalence of PDs in asthmatic horses.

We hypothesized that PDs are frequent in horses with SEA exacerbation and associated with more severe clinical symptoms, and that the effective treatment of SEA leads to clinical improvement in both SEA and PDs, while an insufficient clinical response results in persisting PDs. Thus, the present study objectives are: (1) to assess the prevalence of PDs in a group of pleasure horses affected by SEA in exacerbation, and investigate whether a decrease can be observed after treatment-induced disease remission; (2) to explore whether the co-occurrence of PDs is associated with more severe asthma symptoms and/or more severe airway inflammation; and (3) to determine whether persisting PDs are associated with a decreased response to asthma treatment.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design

A prospective, longitudinal, observational study was conducted on forty-six ( $n = 46$ ) horses affected by SEA. Examinations were performed between 2020 and 2022 by field services from the Large Animal Veterinary Teaching Hospital, Warsaw University of Life Sciences. Initial inclusion criteria were based on a documented history consistent with SEA (recurrent episodes of respiratory distress) and the presence of an ongoing SEA exacerbation episode at the moment of baseline examination. Horses with recent history (within the previous four weeks) of corticosteroids, bronchodilators, antibiotics, and allergen immunotherapy administration were excluded from the study. All horses underwent an initial examination (baseline) that included the collection of medical history, general physical, and detailed respiratory tract examinations, resting upper and lower airway endoscopy, tracheal wash (TW) cytology and bacterial culture, and BALF cytology. A baseline overground dynamic endoscopy was also performed the next day to investigate the presence of PDs. Starting from the day after baseline examination, the horses were treated for asthma for 21 days. The horses were subsequently re-evaluated with a follow-up examination that included general physical and detailed respiratory tract examinations, and a follow-up overground endoscopy. The clinicians performing the follow-up examinations were blinded to the results obtained at baseline examination. Both baseline and follow-up endoscopic examinations were assessed by two clinicians independently. The final scores used for statistics were decided as the mean variables; however, there were no discrepancies in the assessment of endoscopic examinations by both clinicians.

All included horses represented privately owned clinical patients. Owners provided written consent for the horse's inclusion in the study and declared that their horses were used for recreational purposes. Since all the performed procedures represented standard diagnostic tests, no ethical approval was required.

### 2.2. Diagnostic Procedures

#### 2.2.1. History and General Physical and Respiratory Tract Examinations

Histories and clinical examinations data were collected, following the relevant professional guidelines [1]. Details regarding environmental and previous medical history were obtained. Feeding regimen, housing, access to the pasture, proximity to hay and straw storages, stable ventilation, and stable cleaning were investigated. The most recent date of corticosteroids, bronchodilators, antibiotics, or specific allergen immunotherapy was recorded [29]. In addition, any history of respiratory noises or exercise intolerance was reported. General physical examination included the evaluation of rectal temperature, heart rate, respiratory rate, mucous membrane color and hydration, capillary refill time, and lymph nodes. Detailed respiratory tract examination included tracheal and thoracic auscultation. Moreover, the presence and intensity of nasal flare, presence and

amount of nasal discharge, presence and frequency of cough, and degree of abdominal lift were assessed.

#### 2.2.2. Resting Endoscopy, Tracheal Wash, and Bronchoalveolar Lavage

Resting endoscopy and cytology were performed following the relevant professional guidelines [30,31]. Endoscopic examination was carried out using a flexible video bronchoscope (8 × 2000 mm; Karl Storz, Berlin, Germany) in sedated horses. The doses of the drugs were determined based on the horse's body weight (b.wt). Horses were sedated with detomidine hydrochloride (Domosedan; Orion Corporation, Espoo, Finland; 0.01 mg/kg b.wt i.v.) and butorphanol tartrate (Torbugesic; Zoetis Polska Sp. z o.o., Warsaw, Poland; 0.01 mg/kg b.wt i.v.). The ipsilateral nasal passage, ethmoidal region, soft palate, pharynx, larynx, trachea, and tracheal septum were examined. Bilateral guttural pouch endoscopy was performed. Tracheal mucus appearance and characteristics (accumulation, color, apparent viscosity, and localization) were determined [32].

Endoscopy-guided TW and BALf collection were performed as previously described using dedicated catheters (KRUUSE, Langeskov, Denmark) [31,33]. For TW examination, 30 mL of sterile saline was instilled to facilitate sample collection from the most ventral aspect of the trachea (tracheal puddle). Then, the samples were placed in a sterile universal container for bacteriological analysis (Deltalab, Barcelona, Spain) and in EDTA tubes for cytological analysis (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). For the further reduction of coughing, 20 mL of warm lidocaine solution (Lidor 20 mg/mL, Richter Pharma, Wels, Austria) was injected in the tracheal septum area.

For BALf sampling, the catheter was passed via the ventral nasal meatus until it was wedged in a bronchus. Then, five 50 mL aliquots of sterile normal saline (Baxter, Warsaw, Poland) were instilled by syringe, aspirated immediately and placed in EDTA tubes. TW and BALf aliquots were centrifuged (300× *g* for 10 min), the supernatant was decanted, and the pellet was placed on the slides to make the smear. The smears were dried, fixated using Cytofix (Samko, Warsaw, Poland) and sent to the commercial veterinary laboratory (Laboklin Laboratory, Warsaw, Poland) for cytology and bacteriology examinations. The cytology results were returned in the form of percentage (%) of neutrophils, macrophages, and lymphocytes in TW and BALf samples separately, whereas the bacteriology results were returned in the form of bacterial growth type and intensity (lack, −; mild, +; moderate, ++; severe, +++). Possible pathogenic bacteria and probable contaminants were differentiated based on Richard et al. [34]. According to these guidelines, only common pathogens were taken into account to consider bacterial infection. Moreover, when more than three types of bacteria were found, the sample was considered to be contaminated.

#### 2.2.3. Dynamic Overground Endoscopy

Dynamic overground endoscopy was performed using portable telemetric endoscopic systems (ETL 2, head mounted Equine Training Laryngoscope; Dr Fritz Endoscopes GmbH, Tuttlingen, Germany). The nose twitch was used to restrain the horse for the safe insertion of the endoscope into the nostril and positioning in the pharynx. The battery and the telemetry system were fixed on the equine's head using a specialized halter. Horses were ridden in the outdoor area by the usual riders who were instructed to adjust the exercise intensity to the horse performance level and the severity of clinical signs of SEA and PD. The recordings were started before the onset of exercise and terminated during the recovery phase. Laryngeal and pharyngeal function, motility of the caudal portion of soft palate, and position of the caudal border of soft palate were evaluated.

#### 2.3. Classification and Scoring System for Equine Asthma

The severity of clinical signs was assessed using a modification of a scoring system recently recommended for severely asthmatic horses and assigned at baseline (prior to treatment, in exacerbation) and repeated at follow up (after treatment, in remission) [35]. The severity of airway inflammation was assigned only at baseline and assessed using a

scoring system that included endoscopic (mucus appearance and characteristics) [32] and BALF cytology findings (BALF neutrophil %) [33]. For scoring purposes, % cell counts other than BALF neutrophil were not considered since SEA is typically characterized by neutrophilic inflammation [31]. The scores were assigned by two independent clinicians and summarized in Table 1.

**Table 1.** Modified score system proposed by Lavoie et al. [35] used for the quantification of the severity of variables and airway inflammation in horses affected by SEA. First seven clinical signs reflect selected results of clinical examination, whereas the subsequent five variables reflect selected results of resting endoscopy and BALF cytology, respectively [1,32]. These two types of variables are separated in Table 1 by a horizontal line. Final score is presented as a total sum of points obtained separately for variables, and endoscopic results. Final score indicates the severity of presented symptoms.

| Clinical Signs        | Descriptor                                                       | Score |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------|-------|
| Respiratory rate      | <16                                                              | 0     |
|                       | 17–20                                                            | 1     |
|                       | 21–30                                                            | 2     |
|                       | >30                                                              | 3     |
| Nasal discharge       | none                                                             | 0     |
|                       | serous                                                           | 1     |
|                       | mucopurulent                                                     | 2     |
| Tracheal auscultation | normal tracheal sounds                                           | 0     |
|                       | slight increase                                                  | 1     |
|                       | clearly audible increased                                        | 2     |
|                       | crackles and wheezing present                                    | 3     |
| Thorax auscultation   | normal pulmonary sounds                                          | 0     |
|                       | slight increased pulmonary sounds                                | 1     |
|                       | clearly audible increased pulmonary sounds                       | 2     |
|                       | crackles and wheezing present                                    | 3     |
| Nostril flare         | none                                                             | 0     |
|                       | present                                                          | 1     |
| Cough score           | none                                                             | 0     |
|                       | coughs at specific times of day (feeding/exercising/making beds) | 1     |
|                       | frequent cough                                                   | 2     |
| Abdominal lift        | none                                                             | 0     |
|                       | slight flattening of ventral flank                               | 1     |
|                       | obvious abdominal lift and “heave line”                          | 2     |
| Maximum score         |                                                                  | 16    |
| Mucus accumulation    | none                                                             | 0     |
|                       | little, multiple small blobs                                     | 1     |
|                       | moderate, larger blobs                                           | 2     |
|                       | marked, confluent or stream-forming thick white to yellow        | 3     |
| Mucus color           | none                                                             | 0     |
|                       | colorless                                                        | 1     |
|                       | white                                                            | 2     |
|                       | yellow                                                           | 3     |
| Mucus localization    | none                                                             | 0     |
|                       | $\frac{1}{2}$ distal                                             | 1     |
|                       | proximal and distal                                              | 2     |
|                       | threading                                                        | 3     |

Table 1. Cont.

| Clinical Signs                | Descriptor   | Score |
|-------------------------------|--------------|-------|
| Mucus apparent viscosity      | none         | 0     |
|                               | fluid        | 1     |
|                               | intermediate | 2     |
|                               | viscous      | 3     |
| Neutrophil percentage in BALf | <5%          | 0     |
|                               | <20%         | 1     |
|                               | 20–60%       | 2     |
|                               | >60%         | 3     |
| Maximum score                 |              | 15    |

#### 2.4. Classification of Palatal Disorders

The presence and classification of PDs was assessed at baseline (in exacerbation, before treatment) and then repeated at follow-up (after treatment, in remission), by two clinicians who independently reviewed overground endoscopy video recordings to assess interobserver repeatability and reliability. For further analysis, the mode of these observations was used.

Both soft palate caudal portion motility and position were assessed, as summarized in Table 2. Palatal instability (PI) was identified when dorsoventral billowing movements of the caudal portion of the soft palate were observed, causing epiglottis flattening (Figure 1C). Dorsal displacement of the soft palate (DDSP) was diagnosed when the caudal border of the soft palate displaced above the epiglottis, preventing its visualization and obstructing the *rima glottis* (Figure 1D) [36,37].

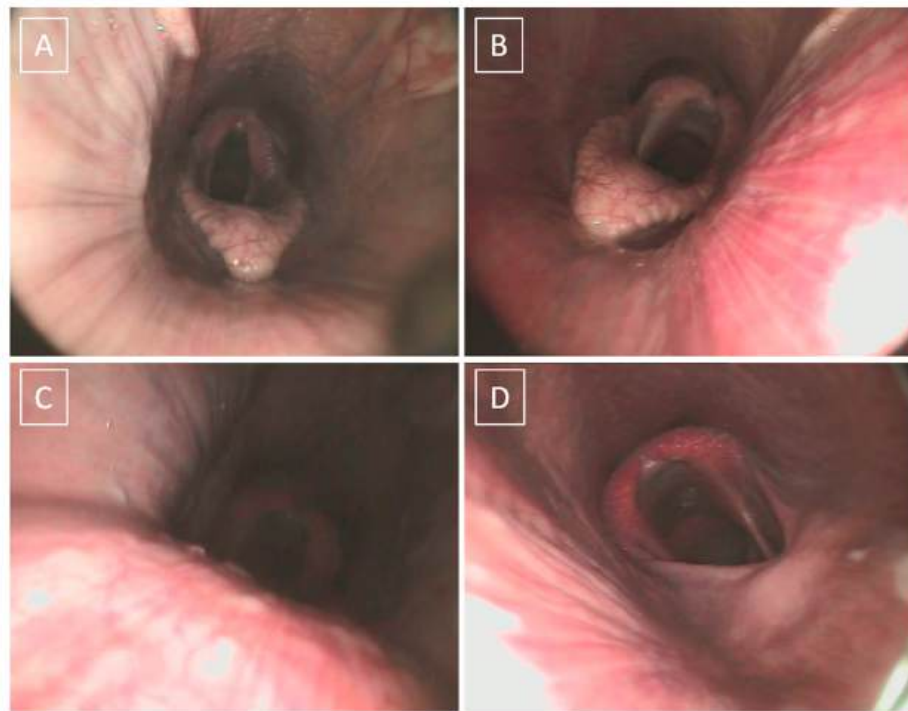
**Table 2.** Endoscopic characteristics of motility and position of the caudal portion of the soft palate in horses with PDs.

| Endoscopic Findings                           | Normal (0)                                                 | Abnormal (1)                                                                                                     |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Motility of the caudal portion of soft palate | Relatively stable position, no movement or lifting present | Dorsoventral billowing movements with flattening of the epiglottis against the dorsal surface of the soft palate |
| Position of the caudal border of soft palate  | Under the epiglottis                                       | Above the epiglottis                                                                                             |

Horses having no signs of palatal disorders were assigned the score 0, and horses showing signs of solely palatal instability or solely palatal displacement were assigned the score 1. As all horses showing DDSP signs had PI, they were assigned score 1 for DDSP (Table 2).

#### 2.5. Treatment Protocols

All horses included in the study underwent a 21-day treatment period starting on the day after baseline examination, according to one of two alternative therapeutic protocols. Both treatment protocols included a combination of steroidal and bronchodilator medications, administered systemically (protocol 1) or topically via nebulization (protocol 2, Flexineb<sup>®</sup>, Nortev Ltd., Galway, Ireland). The protocol assigned to each horse was chosen based on clinical signs severity, owner's preferences and/or availability of nebulization equipment. Thirty-six horses were treated according to protocol 1, while 10 horses were treated according to protocol 2. In the case of TW-positive bacterial growth, antimicrobial therapy was administered based on susceptibility results. Details of the protocols used are reported in Table 3.



**Figure 1.** Summary of overground endoscopy findings. Normal position of the soft palate and epiglottis in a healthy horse, not included in this study (A). Normal position of the soft palate and epiglottis in horse with severe equine asthma (SEA). Note the hyperemia of the pharyngeal mucosa and the presence of light discharge (B). Palatal instability in horse with SEA. The soft palate is billowing in front of the epiglottis, obscuring the rima glottides. Although the caudal part of the pharynx cannot be visualized, dynamic assessment allows intermittent identification of the caudal border of the palate still being localized below the epiglottis (C). Dorsal displacement of the soft palate (DDSP) in horse with SEA. Note that the caudal edge of the soft palate is positioned dorsal to the epiglottis (D).

The SEA treatment protocol also included the long-term environmental change. Grass pasture and low dust feed were recommended to alleviate the clinical signs and provide long-lasting improvement [6].

## 2.6. Data Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$  for all the statistical analyses performed.

### 2.6.1. Descriptive Statistics

Descriptive statistics (percentages, number of horses) were used to analyze data collected from the history, physical examination, TW, BALf (neutrophil count), and TW bacteriology. Medians, interquartile ranges, and minimum and maximum values were calculated for ordinal variables such as clinical and mucus appearance scores, for all horses and for each group of PDs (PI, DDSP, no PDs) at baseline and follow up. Continuous variables (such as BALf and TW neutrophil %) were analyzed for normality using the Shapiro–Wilk test. Since data were not normally distributed, medians, interquartile ranges, and minimum and maximum values were calculated for all horses, and for each group of PDs.

**Table 3.** Details of treatment protocols used in the study.

| Protocol 1                                            |       |                             |                 |                         |
|-------------------------------------------------------|-------|-----------------------------|-----------------|-------------------------|
| Medication                                            | Day   | Frequency of Administration | Dosage          | Route of Administration |
| Dexamethasone<br>2 mg/mL                              | 1–3   | Every 24 h                  | 0.08 mg/kg b.wt | intramuscular           |
|                                                       | 4–6   | Every 24 h                  | 0.06 mg/kg b.wt |                         |
|                                                       | 7–12  | Every 48 h                  | 0.06 mg/kg b.wt |                         |
|                                                       | 13–18 | Every 48 h                  | 0.04 mg/kg b.wt |                         |
|                                                       | 19–21 | Every 48 h                  | 0.02 mg/kg b.wt |                         |
| Clenbuterol<br>0.016 mg/g                             | 1–14  | Every 12 h                  | 0.8 µg/kg b.wt  | per os                  |
| Protocol 2                                            |       |                             |                 |                         |
| Budesonide<br>500 µg/mL                               | 1–21  | Every 12 h                  | 2000 µg/horse   | nebulization            |
| Ipratropium bromide<br>(0.5 mg + 0.25 mg/mL)          | 1–14  | Every 12 h                  | 0.3 µg/kg b.wt  | nebulization            |
| Additional antimicrobial treatment                    |       |                             |                 |                         |
| Trimethoprim and sulfadiazine<br>(100 mg/g + 20 mg/g) | 1–7   | Every 24 h                  | 25 mg/kg b.wt   | per os                  |
| Ceftiofur sodium (50 mg/mL)                           | 1–7   | Every 24 h                  | 3 mg/kg b.wt    | intramuscular           |

### 2.6.2. Prevalence of PDs

The prevalence of PDs in horses with SEA during disease exacerbation and remission were estimated. The prevalence of PI and DDSP was calculated before and after SEA treatment, separately. Expected and observed values were entered as percentages representing PI and DDSP distributions, respectively.

### 2.6.3. Association between “Clinical Severity” Scoring, “Airway Inflammation” Scoring, and PDs Occurrence

In the dataset, each horse was assigned a “clinical severity” scoring value, an “airway inflammation” scoring value, and 0 or 1 for PI and DDSP. Horses with 1 in the PI column and 0 in the DDSP column qualified for the PI group. Horses with 1 in the PI column and 1 in the DDSP column qualified for the DDSP group. Horses with 0 in the PI column and 0 in the DDSP column qualified for the no-PD-signs group. All horses affected by both DDSP and PI were placed in the DDSP group, and thus no subject was classified as belonging to both groups. Additionally, a total group was presented as all horses’ results regardless of annotation.

The medians, interquartile range, and minimum and maximum values for the clinical scoring parameters and the % of neutrophils in airway cytology were calculated for horses without PD, PI, and DDSP, prior to asthma treatment. For clinical scoring re-evaluated after treatment, medians, interquartile ranges, and minimum and maximum values were also calculated at follow-up.

Data series % of neutrophils were tested independently for univariate distributions using a Shapiro–Wilk normality test. The data did not follow a normal distribution. For the clinical scoring parameters, the distribution was not continuous. The comparison between PI signs, DDSP signs, and the no PD signs data series was assessed using the Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s multiple comparisons test. As after SEA treatment no PI signs were reported, the comparison between DDSP signs and no PD signs groups was assessed using the Mann–Whitney test.



#### 2.6.4. Association between Clinical Response and PDs' Persistence after Treatment

To compare whether the clinical scoring parameters changed after treatment, a Wilcoxon's Signed Rank test was used. The comparison was performed only including those subjects whose classification did not change with treatment. Thus, the treatment-related comparison was performed for DDSP and no-PD signs groups only.

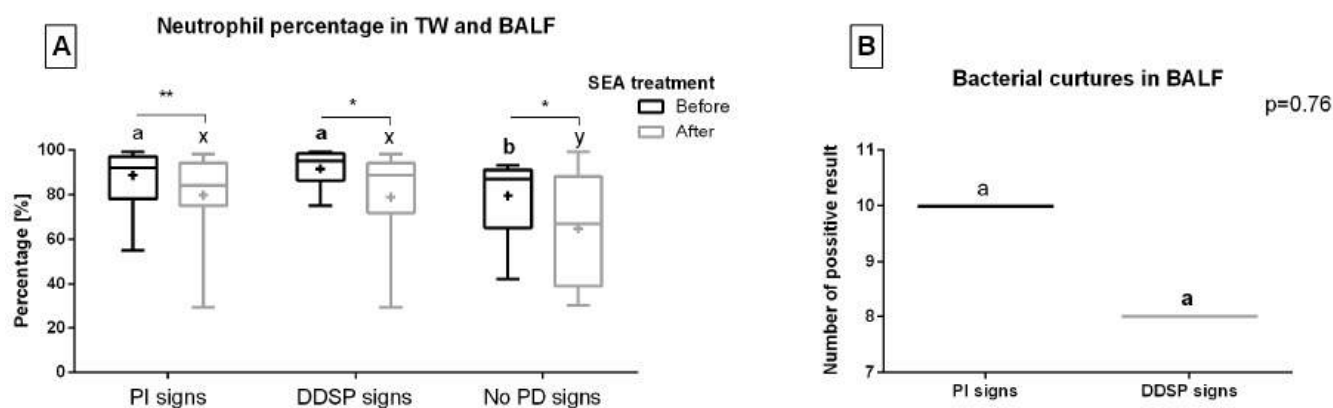
### 3. Results

#### 3.1. Descriptive Statistics Results

The study population included 24 mares and 31 geldings of different breeds (12 mix-breeds, 3 Arabian horses, 5 Thoroughbred, 3 Wielkopolski horses, 4 Silesian horses, 1 quarter horse, 3 Hucul horses, 8 Polish Half-Bred horses, 3 Belgian horses, 2 Irish cobs and 2 Hanoverian horses), aged between 4 and 27 years (mean  $\pm$  SD: 13.4  $\pm$  5.0). All the horses presented clinical signs of SEA.

The baseline details of the horses enrolled in the study, including history, basic clinical examination, results for clinical severity scoring and airway inflammation scoring, as well as results for BALf cytology, TW cytology, and TW bacteriology are presented in the Supplementary Materials (a brief description of the history, Tables S1 and S2).

Given that no resting endoscopy was performed after SEA treatment, the results of cytology and bacteriology were presented only before treatment. The mean neutrophil percentage in TW ranged from 79% in horses with no PDs signs to 89% and 92% in horses with PI and DDSP, respectively. Moreover, a higher neutrophil percentage in TW was found in horses with PDs than without, regardless of PD type. On the other hand, the mean neutrophil percentage in BALf ranged from 65% in horses with no PDs signs to 79% and 80% in horses with DDSP and PI, respectively. Similar to TW, a higher neutrophil percentage in BALf was found in horses with PDs than without. The neutrophil percentage in TW was higher than in BALf in total, PI signs, and DDSP signs groups, unlike the no PDs signs group (Figure 2A).



**Figure 2.** Cytology and bacteriology results obtained before severe equine asthma (SEA) treatment. Data in box plots are represented by lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. Additionally, the mean values are marked by "+". Data are presented for horses with palatal instability (PI) signs, dorsal displacement of soft palate (DDSP) signs, and no palatal disorders (no PDs) signs. Neutrophil percentage in tracheal wash (TW) and broncho-alveolar lavage fluid (BALf) (A), and number of positive results of bacteriology in TW (B), are presented separately. Asterisks indicate differences between TW and BALf (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ). Lowercase letters indicate differences between PI, DDSP, and no PDs signs groups for  $p < 0.05$ .

In the DDSP group, within eight TW samples, the mixed growth of at least two bacteria species was confirmed. In samples collected from four horses, a mild (+) to moderate (++) growth of *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, and *Enterobacter* spp. was found. In samples collected from two horses, a moderate (++) to severe (+++) growth of

*Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* was noted, contaminated by *Wickerhamomyces anomalus* and *Rahnella aquatilis*, respectively. In samples collected from one horse, a moderate (++) growth of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* contaminated by moderate (++) growth of *Actinobacillus equuli*, *Actinobacillus rosii*, and *Enterobacter ludwigii* was demonstrated. A moderate (++) to severe (+++) growth of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Lelliottia amnigena*, and *Enterobacter asburiae* was detected in the last sample, with bacterial growth in the DDSP group. In the PI group, the mixed growth of at least two bacteria species was confirmed in ten TW samples, of which eight TW were the samples described above. The remaining two TW samples showed a mild (+) to moderate (++) growth of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. One of these two BALF samples also showed a mild (+) to moderate (++) growth of *Pseudomonas* spp. and *Serratia marcescens*. In the no PD signs group, no bacterial growth was found in any TW sample (Figure 2B).

### 3.2. Prevalence of PDs

During the exacerbation phase, PDs were found in 31 horses (67.4%), whereas DDSP was diagnosed in 18 horses (39.1%). One may note that in 18 horses (39.1%) the co-occurrence of PI and DDSP was noted, in 13 horses (28.3%) just PI was observed, whereas in 15 horses (32.6%) no clinical signs of PDs were recognized. After SEA treatment, in the remission phase no PI was found (0%), whereas DDSP was noted in four horses (8.7%). One may observe that in 42 horses (91.3%), no clinical signs of PDs were recognized. Comparing the pattern of PDs prevalence, PI appeared more frequently than DDSP before SEA treatment ( $p < 0.0001$ ) as well as after SEA treatment ( $p = 0.031$ ). Regardless of the type of diagnosed PDs, the prevalence of PI and DDSP was significantly lower after than before SEA treatment ( $p < 0.0001$ ) (Table 4).

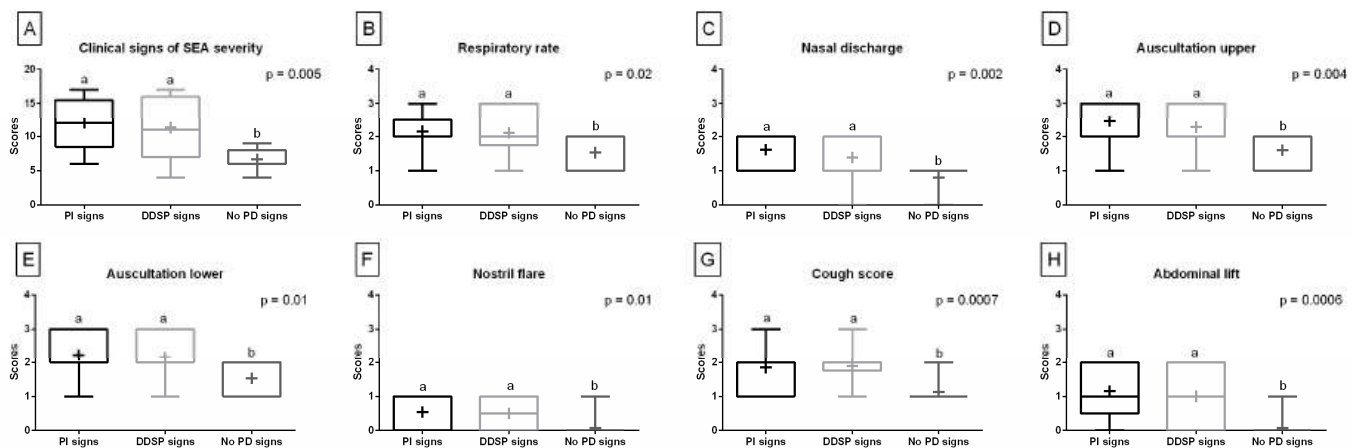
**Table 4.** The prevalence of palatal disorders (PDs) including palatal instability (PI) and dorsal displacement of the soft palate (DDSP) in horses before and after severe equine asthma (SEA) treatment.

| Before SEA Treatment |         |            |            |             |
|----------------------|---------|------------|------------|-------------|
| PI                   |         | DDSP       |            | Totals      |
|                      |         | Present    | Absent     |             |
|                      | Present | 18 (39.1%) | 13 (28.3%) |             |
|                      | Absent  | 0          | 15 (32.6%) |             |
| Totals               |         | 18 (39.1%) | 28 (60.9%) | 46 (100.0%) |
| After SEA treatment  |         |            |            |             |
| PI                   |         | DDSP       |            | Totals      |
|                      |         | Present    | Absent     |             |
|                      | Present | 0          | 0          |             |
|                      | Absent  | 4 (8.7%)   | 42 (91.3%) |             |
| Totals               |         | 4 (8.7%)   | 42 (91.3%) | 46 (100.0%) |

### 3.3. Association between “Clinical Severity” Scoring, “Airway Inflammation” Scoring, and PDs Occurrence

Comparing the quantified clinical signs obtained before SEA treatment, the scores' values were higher in the PI and DDSP signs groups than in the no PDs signs group. No differences were found between the PI and DDSP signs groups. These differences were noted for the sum of clinical signs (Figure 3A), respiratory rate (Figure 3B), nasal discharge (Figure 3C), upper respiratory tract auscultation (Figure 3D), lower respiratory tract auscultation (Figure 3E), nostril flare (Figure 3F), cough score (Figure 3G), and abdominal lift (Figure 3H), separately.



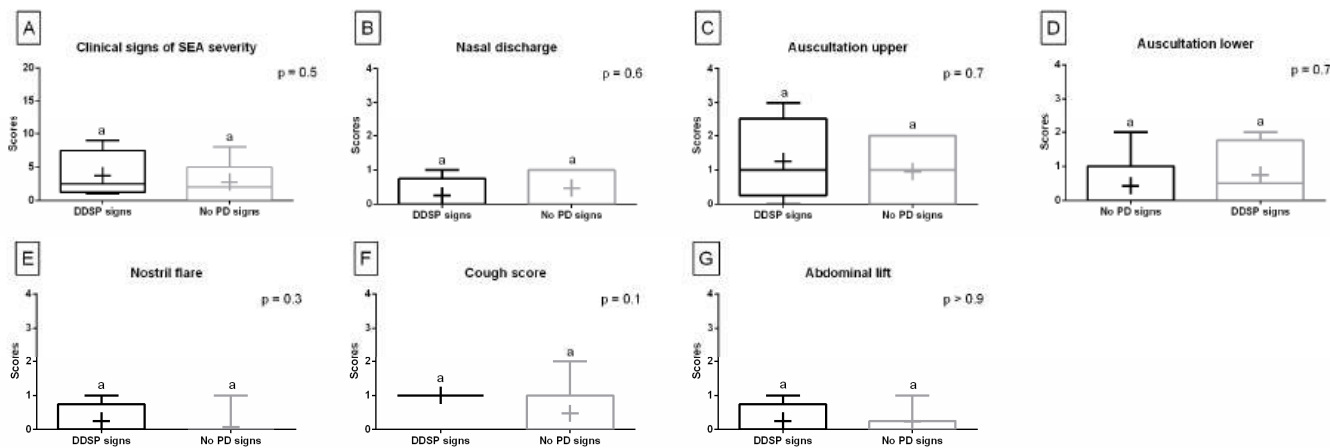


**Figure 3.** Clinical signs of the equine asthma (EA) severity quantified before treatment. Data in box plots are represented by lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. Additionally, the mean values are marked by “+”. Data are for horses with palatal instability (PI) signs, dorsal displacement of soft palate (DDSP) signs, and no palatal disorders (no PDs) signs. Scores are presented for the sum of the clinical signs (A) as well as for each of the following signs separately: respiratory rate (B), nasal discharge (C), upper respiratory tract auscultation (D), lower respiratory tract auscultation (E), nostril flare (F), cough score (G), and abdominal lift (H). Lowercase letters indicate differences between PI, DDSP, and no PDs signs groups for  $p < 0.05$ .

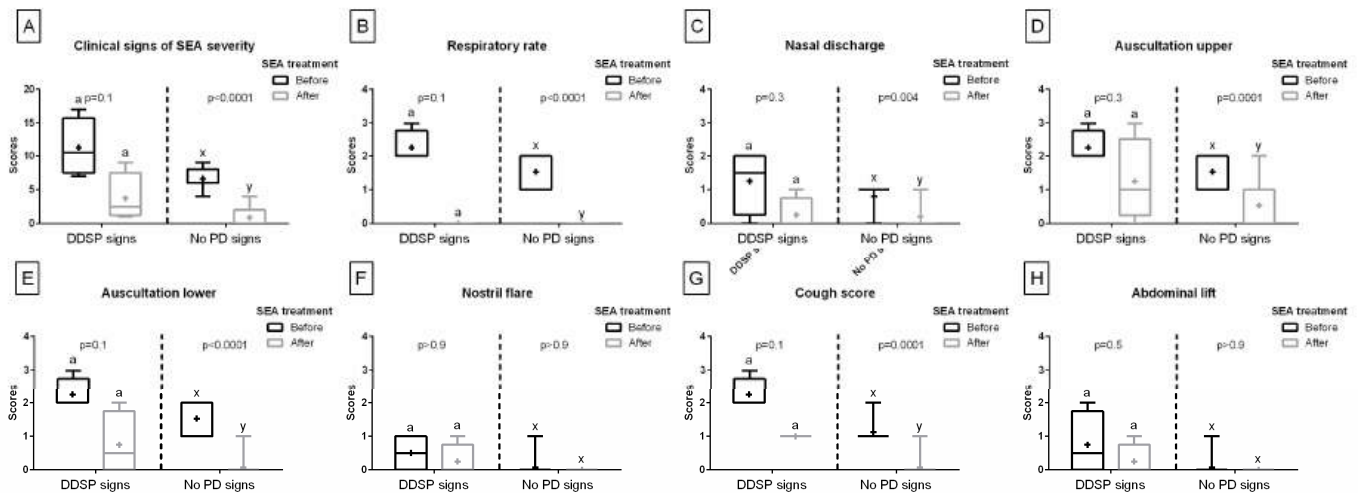
Comparing the quantified clinical signs obtained after SEA treatment, one may note that none of the examined horses showed PI signs and horses with DDSP did not show increased respiratory rate. Therefore, for these signs no bars were shown on the plots. No differences were found for the score values between the DDSP signs group and no PDs signs group for the sum of clinical signs (Figure 4A), nasal discharge (Figure 4B), upper respiratory tract auscultation (Figure 4C), lower respiratory tract auscultation (Figure 4D), nostril flare (Figure 4E), cough score (Figure 4F), and abdominal lift (Figure 4G).

### 3.4. Association between Clinical Response and PDs' Persistence after Treatment

Comparing the quantified clinical signs between pre- and post-SEA-treatment sampling, one may observe a small number of horses that still showed signs of DDSP after treatment ( $n = 4$ ). For these horses, no treatment-related differences were found for the sum of clinical signs (Figure 5A), respiratory rate (Figure 5B), nasal discharge (Figure 5C), upper respiratory tract auscultation (Figure 5D), lower respiratory tract auscultation (Figure 5E), nostril flare (Figure 5F), cough score (Figure 5G), and abdominal lift (Figure 5H). On the other hand, worse clinical signs in the no PDs group ( $n = 15$ ) were noted before rather than after treatment for the sum of clinical signs (Figure 5A), respiratory rate (Figure 5B), nasal discharge (Figure 5C), upper respiratory tract auscultation (Figure 5D), lower respiratory tract auscultation (Figure 5E), and cough score (Figure 5G), but not for nostril flare (Figure 5F) and abdominal lift (Figure 5H).



**Figure 4.** Clinical signs of the equine asthma (EA) severity quantified after treatment. Data in box plots are represented by lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. Additionally, the mean values are marked by “+”. Data are presented for horses with palatal instability (PI) signs, dorsal displacement of soft palate (DDSP) signs, and no palatal disorders (no PDs) signs. Scores presented for the sum of the clinical signs (A) as well as for each of the following signs separately: nasal discharge (B), upper respiratory tract auscultation (C), lower respiratory tract auscultation (D), nostril flare (E), cough score (F), and abdominal lift (G). Lowercase letters indicate differences between PI, DDSP, and no PDs signs groups for  $p < 0.05$ .



**Figure 5.** Clinical signs of the equine asthma (EA) severity compared before and after treatment. Data in box plots are represented by lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. Additionally, the mean values are marked by “+”. Data are presented for horses with dorsal displacement of soft palate (DDSP) signs and no palatal disorders (no PDs) signs. Scores presented for the sum of the clinical signs (A) as well as for each of the following signs separately: Respiratory rate (B), nasal discharge (C), upper respiratory tract auscultation (D), lower respiratory tract auscultation (E), nostril flare (F), cough score (G), and abdominal lift (H). Lowercase letters indicate differences between treatment periods for  $p < 0.05$ . As in this comparison the DDSP and No PD signs groups have not been compared, they are separated on a plot by a dashed line.

#### 4. Discussion

As equine and human asthma share many similarities, EA has been proposed as a good animal model to understand airway remodeling mechanisms and to assess the efficiency

of HA treatment [3]. Thus, one may ask, may the assumptions of the UAD concept be successfully implemented in equine medicine?

Few recent research works have investigated the co-occurrence between dynamic upper airway disorders and lower airway inflammation [28,38–42]. Wysocka et al. found a higher prevalence of PI and nasopharyngeal collapse in various horses with mild-moderate equine asthma (mild-MEA) [39]. Courouge-Malblanc et al. evidenced the high frequency of DDSP in Trotters with lower airway inflammation [38], while Joó et al. introduced SEA as an underlying cause of DDSP [28]. The exact causality of this co-occurrence has not been proven. However, in contrast to these research works and UAD concepts stays some studies based on racehorses populations [40,41].

In our study we revealed the high prevalence of PDs in horses during SEA exacerbation, which significantly decreased after asthma treatment. Underlying causes of the PDs may be related to inflammation, as a possible cause of neuromuscular weakness of the soft palate muscles [8,43,44]. Grade 3 pharyngeal lymphoid hyperplasia (PHL) has already been associated with the occurrence of epiglottic flaccidity and DDSP [13]. Treatment regimens include anti-inflammatory steroidal or non-steroidal drug therapy. In the case of SEA, exacerbation control is based on the administration of corticosteroids and bronchodilators, systemically or topically, in association with long-term environmental changes, as relapses of clinical signs are often observed soon after drug cessation [7]. In our study all the horses showed a reduction in the signs severity of both PDs and SEA in response to steroidal administration. This may reflect that inflammation might represent an underlying component of both conditions.

One may observe that, during exacerbation, clinical signs and airway inflammation appeared more severe in horses with PDs, while these differences were not detected after treatment. Moreover, SEA horses with PDs seemed to have lower clinical responses to the treatment compared to horses without PDs. These findings show that PDs' frequency increases with disease severity. Different possible scenarios may be proposed to explain the relationship between the presence of upper airway instability, inflammation and EA: (1) the spreading of the inflammatory process via the continuum airway epithelium, as both the upper and lower airway consist of ciliated pseudostratified columnar cells; (2) due to persistent higher negative pressure caused by increased lower airway resistance [43–46]; or (3) the independent coexistence of upper airway inflammation and/or PDs, as they were not excluded before EA exacerbation. Moreover, there was no control group used to assess the prevalence of palatal dysfunction in non-asthmatic horses, and the numbers of horses with persisting PD was low, which may have led to derived bias. Furthermore, it is worth noting that PDs create a cascade of aerodynamic problems independently in the equine respiratory tract, and even a slight soft palate elevation leads to a further increase in inspiratory negative pressure, which in turn will exacerbate the elevation [47]; thus, a more detailed experimental protocol is still required.

It has been suggested that PI always precedes the development of DDSP [36,37], suggesting that PI may represent a preliminary stage of DDSP. This is in agreement with our study, where all of the horses showing DDSP were concomitantly affected by PI. Moreover, in our study PI was more frequent than DDSP; however, after treatment only cases of DDSP were identified. In relation to the four cases with persistent DDSP after SEA treatment, we can only hypothesize the reasons behind this finding. It is possible that a permanent neuromuscular dysfunction of soft palate structures, resulted from chronic and reversible disease exacerbation or persisted from the previous coexistence of EA and DDSP. However, before EA exacerbation, none of those horses showed signs of abnormal respiratory noise or intensive cough episodes during exercise. In our caseload, anatomical malformations of the nasopharynx as a possible cause of PDs were excluded via endoscopic examination.

Another interesting fact worth considering is that exposure to systemic corticosteroids,  $\beta$ -2-mimetic agents, and acetylcysteine may lead to noticeable myocyte damage. In people with chronic obstructive pulmonary disease [48], as well as in horses with pulmonary

dysfunction [49], structural changes in skeletal muscles were evidenced. Those alterations were considered multifactorial and were presumably caused by both the local and systemic inflammation and the administration of the above-mentioned drug therapy. Therefore, we may suggest that repeated treatments during recurrent asthma exacerbations may negatively influence the neuromuscular function of palatal muscles. However, this is only another hypothesis that needs further investigation to be confirmed or refuted.

Based on current knowledge, TW and BALf results were positively correlated with clinical signs of respiratory distress [50], whereas the association of poor performance and exercise intolerance was acknowledged only with BALf, which is the main indicator of lower airway inflammation [15,51]. In the presented caseload, one may observe higher neutrophil percentages in both BALf and TW in horses with PDs, which was in accordance with a previous study demonstrating the positive correlation between PDs' occurrence and cytology results [38]. However, the neutrophil percentage and bacterial growth were higher in TW than BALf in SEA horses with co-occurring PDs. In contrast, the horses without PDs demonstrated similar neutrophil percentages in TW and BALf. Given that TW cytology is an indicator of tracheal inflammation, and that the trachea is directly adjacent to the upper airway, the theory of the spread of the inflammation process via the continuum airway epithelium again may be supported by the present study [14]. One may observe that a very large majority of the same bacterial communities is present in both the upper and the lower airways, showing an overlap and some continuity in the bacterial population between the two anatomical environments in healthy horses [52]. Additionally, horses with co-occurring palatal disorders had higher TW bacterial growth rate compared to asthmatic horses without palatal disorders. Weaknesses regarding bacterial culture in our study include the route of sample collection, which is anterior at avoiding contamination compared to the percutaneous transtracheal method, and secondly a low number of horses with positive culture is not sufficient to indicate an important role in etiology, having taken into account multiple independent sources of variation. However, one should note contamination as a limitation of the bacteriology sampling via endoscope.

When considering the clinical usefulness of the presented results, the following limitations of this research and future directions should be mentioned. In the current study, mild-MEA was not taken into consideration. However, one may observe that horses affected by mild-MEA are more frequently used for exercise than horses affected by SEA. Therefore, in mild-MEA horses, severe exercise intolerance is reported more frequently and the usefulness of the clinical implications of prevalence and response to the treatment of PDs in mild-MEA horses seems to be higher. Therefore, in further studies, mild-MEA horses should also be included. Responses to the SEA treatment should be considered in further research on EA and PDs, regardless of their severity. The results presented in the current study may suggest both an association between SEA and PDs and similar responses to similar treatments. Therefore, the suggested association requires further research on the dependent or independent resolution of PDs after SEA treatment, relationship, and causality. One may summarize that in horses with SEA, signs of other airway diseases are often underestimated due to focusing on the most problematic signs from the lower airways [38]. On the other hand, the neuromuscular dysfunction of the soft palate can be treated surgically to improve the athletic performance of PDs-affected horses. The recommended method of surgical treatment of DDSP is laryngeal tie-forward [8]; however, laser palatoplasty may also be performed [8]. Considering the risk of general anesthesia, surgery costs, and changeable improvement rates, a detailed respiratory tract examination, focusing not only on the upper but also on the lower airway, should be strongly recommended before surgical treatment of DDSP. According to the "UAD" concept, the detection of co-morbidities such as SEA, which may be the primary cause of PDs, can contribute to the achievement of a successful outcome with as little risk and cost of treatment as possible.

## 5. Conclusions

The current study supports the theory that inflammation might play a significant role in the pathophysiology of both diseases. In particular, co-occurring palatal disorders might reflect the presence of more widespread and severe inflammation and can contribute to diminishing the response to treatment, and facilitate complications such as lower airway bacterial contamination. One could say that conservative therapy with anti-inflammatories should always be attempted to treat palatal disorders before electing surgical intervention. Based on this study, if the horse is diagnosed only with palatal instability (no displacement) and concurrent lower airway inflammation is detected, there is a good chance that the palatal instability would resolve, after the inflammation has been treated. However, the association between SEA and PDs requires further research.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani13121962/s1>. A brief description of the history of horses enrolled in the study, Table S1: Details of the basic physical examination of horses enrolled in the study; Table S2: Details of the specific clinical examination of horses enrolled in the study.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.K.; methodology, N.K., M.W. and M.D.; software, N.K. and M.D.; validation, M.W. and B.P.; formal analysis, N.K. and M.D.; investigation, N.K. and M.W.; resources, N.K. and B.P.; data curation, N.K.; writing—original draft preparation, N.K. and M.D.; writing—review and editing, N.K., M.W., M.D. and B.P.; visualization, N.K. and M.D.; supervision, M.D.; project administration, N.K.; funding acquisition, N.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** This research, using the results of veterinary clinical examinations, does not fall under the legislation for the protection of animals used for scientific purposes, national decree-law Dz. U. 2015 poz. 266 and 2010-63-EU directive. No ethical approval was needed according to the list of exemptions of the II Local Committee for Ethics in Animal Research of Warsaw University of Life Sciences (WULS—SGGW).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Couëtil, L.L.; Cardwell, J.M.; Gerber, V.; Lavoie, J.-P.; Léguillette, R.; Richard, E.A. Inflammatory Airway Disease of Horses—Revised Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 503–515. [\[CrossRef\]](#)
2. Couetil, L.; Cardwell, J.M.; Leguillet, R.; Mazan, M.; Richard, E.; Bienzle, D.; Bullone, M.; Gerber, V.; Ivester, K.; Lavoie, J.-P.; et al. Equine Asthma: Current Understanding and Future Directions. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 450. [\[CrossRef\]](#)
3. Bullone, M.; Lavoie, J.-P. The Equine Asthma Model of Airway Remodeling: From a Veterinary to a Human Perspective. *Cell Tissue Res.* **2020**, *380*, 223–236. [\[CrossRef\]](#)
4. Bond, S.; Léguillette, R.; Richard, E.A.; Couetil, L.; Lavoie, J.-P.; Martin, J.G.; Pirie, R.S. Equine Asthma: Integrative Biologic Relevance of a Recently Proposed Nomenclature. *J. Vet. Intern. Med.* **2018**, *32*, 2088–2098. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Kozłowska, N.; Wierzbicka, M.; Jasiński, T.; Domino, M. Advances in the Diagnosis of Equine Respiratory Diseases: A Review of Novel Imaging and Functional Techniques. *Animals* **2022**, *12*, 381. [\[CrossRef\]](#)
6. Léguillette, R. Recurrent Airway Obstruction—Heaves. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **2003**, *19*, 63–86. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Simões, J.; Sales Luís, J.P.; Tilley, P. Owner Compliance to an Environmental Management Protocol for Severe Equine Asthma Syndrome. *J. Equine Vet. Sci.* **2020**, *87*, 102937. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Barakzai, S.Z.; Hawkes, C.S. Dorsal Displacement of the Soft Palate and Palatal Instability. *Equine Vet. Educ.* **2010**, *22*, 253–264. [\[CrossRef\]](#)
9. Franklin, S.H.; Naylor, J.R.J.; Lane, J.G. Videoendoscopic Evaluation of the Upper Respiratory Tract in 93 Sport Horses during Exercise Testing on a High-Speed Treadmill. *Equine Vet. J. Suppl.* **2006**, *38*, 540–545. [\[CrossRef\]](#)
10. Holcombe, S.J.; Derksen, F.J.; Stick, J.A.; Robinson, N.E. Effect of Bilateral Blockade of the Pharyngeal Branch of the Vagus Nerve on Soft Palate Function in Horses. *Am. J. Vet. Res.* **1998**, *59*, 504–508.



11. Cheetham, J.; Pigott, J.H.; Hermanson, J.W.; Campoy, L.; Soderholm, L.V.; Thorson, L.M.; Ducharme, N.G. Role of the Hypoglossal Nerve in Equine Nasopharyngeal Stability. *J. Appl. Physiol.* **2009**, *107*, 471–477. [\[CrossRef\]](#)
12. Ducharme, N.G.; Hackett, R.P.; Woodie, J.B.; Dykes, N.; Erb, H.N.; Mitchell, L.M.; Soderholm, L.V. Investigations into the Role of the Thyrohyoid Muscles in the Pathogenesis of Dorsal Displacement of the Soft Palate in Horses. *Equine Vet. J.* **2003**, *35*, 258–263. [\[CrossRef\]](#)
13. Holcombe, S.; Ducharme, N. Disorders of the Nasopharynx and Soft Palate. In *Equine Respiratory Medicine and Surgery*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2007; pp. 437–457, ISBN 978-0-7020-2759-8.
14. Couroucé, A.; Geffroy, O.; Barrey, E.; Auvinet, B.; Rose, R.J. Comparison of Exercise Tests in French Trotters under Training Track, Racetrack and Treadmill Conditions. *Equine Vet. J. Suppl.* **1999**, *31*, 528–532. [\[CrossRef\]](#)
15. Holcombe, S.J.; Derksen, F.J.; Stick, J.A.; Robinson, N.E. Pathophysiology of Dorsal Displacement of the Soft Palate in Horses. *Equine Vet. J.* **2010**, *31*, 45–48. [\[CrossRef\]](#)
16. Van Erck, E. Dynamic Respiratory Videoendoscopy in Ridden Sport Horses: Effect of Head Flexion, Riding and Airway Inflammation in 129 Cases. *Equine Vet. J.* **2011**, *43*, 18–24. [\[CrossRef\]](#)
17. Pigott, J.H.; Ducharme, N.G.; Mitchell, L.M.; Soderholm, L.V.; Cheetham, J. Incidence of Swallowing during Exercise in Horses with Dorsal Displacement of the Soft Palate: Swallowing in Horses with DDSP. *Equine Vet. J.* **2010**, *42*, 732–737. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Desmaizieres, L.-M.; Serraud, N.; Plainfosse, B.; Michel, A.; Tamzali, Y. Dynamic Respiratory Endoscopy without Treadmill in 68 Performance Standardbred, Thoroughbred and Saddle Horses under Natural Training Conditions. *Equine Vet. J.* **2009**, *41*, 347–352. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Giovannini-Chami, L.; Paquet, A.; Sanfiorenzo, C.; Pons, N.; Cazareth, J.; Magnone, V.; Lebrigand, K.; Chevalier, B.; Vallauri, A.; Julia, V.; et al. The “One Airway, One Disease” Concept in Light of Th2 Inflammation. *Eur. Respir. J.* **2018**, *52*, 1800437. [\[CrossRef\]](#)
20. Tiotiu, A.; Novakova, P.; Baiardini, I.; Bikov, A.; Chong-Neto, H.; de-Sousa, J.C.; Emelyanov, A.; Heffler, E.; Fogelbach, G.G.; Kowal, K.; et al. Manifesto on United Airways Diseases (UAD): An Interasma (Global Asthma Association—GAA) Document. *J. Asthma* **2022**, *59*, 639–654. [\[CrossRef\]](#)
21. Bousquet, J.; Khaltaev, N.; Cruz, A.A.; Denburg, J.; Fokkens, W.J.; Togias, A.; Zuberbier, T.; Baena-Cagnani, C.E.; Canonica, G.W.; van Weel, C.; et al. Allergic Rhinitis and Its Impact on Asthma (ARIA) 2008 Update (in Collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy* **2008**, *63* (Suppl. S86), 8–160. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Feng, C.H.; Miller, M.D.; Simon, R.A. The United Allergic Airway: Connections between Allergic Rhinitis, Asthma, and Chronic Sinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy* **2012**, *26*, 187–190. [\[CrossRef\]](#)
23. Alkhalil, M.; Schulman, E.; Getsy, J. Obstructive Sleep Apnea Syndrome and Asthma: What Are the Links? *J. Clin. Sleep Med. JCSM Off. Publ. Am. Acad. Sleep Med.* **2009**, *5*, 71–78. [\[CrossRef\]](#)
24. Li, R.-C.; Singh, U.; Windom, H.P.; Gorman, S.; Bernstein, J.A. Clinical Associations in the Diagnosis of Vocal Cord Dysfunction. *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* **2016**, *117*, 354–358. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Settipane, R.J.; Hagy, G.W.; Settipane, G.A. Long-Term Risk Factors for Developing Asthma and Allergic Rhinitis: A 23-Year Follow-up Study of College Students. *Allergy Proc. Off. J. Reg. State Allergy Soc.* **1994**, *15*, 21–25. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Sekosan, M.; Zakkar, M.; Wenig, B.L.; Olopade, C.O.; Rubinstein, I. Inflammation in the Uvula Mucosa of Patients With Obstructive Sleep Apnea. *The Laryngoscope* **1996**, *106*, 1018–1020. [\[CrossRef\]](#)
27. Waldmann, A.; Meira, C.; Auer, U.; Böhme, S.; Braun, C.; Bohm, S.; Mosing, M. Contribution of Finite Element Model of Animals to Data Base. In Proceedings of the 17th International Conference on Electrical Impedance, Stockholm, Sweden, 19–23 June 2016.
28. Joó, K.; Povászai, Á.; Nyerges-Bohák, Z.; Szenci, O.; Kutasi, O. Asthmatic Disease as an Underlying Cause of Dorsal Displacement of the Soft Palate in Horses. *J. Equine Vet. Sci.* **2021**, *96*, 103308. [\[CrossRef\]](#)
29. Nanda, A.; Wasan, A.N. Clinical Assessment of Allergen Immunotherapy with Differing Doses of Horse Extract. *Ann. Allergy Asthma Immunol. Off. Publ. Am. Coll. Allergy Asthma Immunol.* **2014**, *112*, 76. [\[CrossRef\]](#)
30. Richard, E.A.; Fortier, G.D.; Denoix, J.-M.; Art, T.; Lekeux, P.M.; Erck, E. van Influence of Subclinical Inflammatory Airway Disease on Equine Respiratory Function Evaluated by Impulse Oscillometry. *Equine Vet. J.* **2009**, *41*, 384–389. [\[CrossRef\]](#)
31. Couetil, L.L.; Rosenthal, F.S.; DeNicola, D.B.; Chilcoat, C.D. Clinical Signs, Evaluation of Bronchoalveolar Lavage Fluid, and Assessment of Pulmonary Function in Horses with Inflammatory Respiratory Disease. *Am. J. Vet. Res.* **2001**, *62*, 538–546. [\[CrossRef\]](#)
32. Gerber, V.; Straub, R.; Marti, E.; Hauptman, J.; Herholz, C.; King, M.; Imhof, A.; Tahon, L.; Robinson, N.E. Endoscopic Scoring of Mucus Quantity and Quality: Observer and Horse Variance and Relationship to Inflammation, Mucus Viscoelasticity and Volume. *Equine Vet. J.* **2004**, *36*, 576–582. [\[CrossRef\]](#)
33. Hoffman, A.M. Bronchoalveolar Lavage: Sampling Technique and Guidelines for Cytologic Preparation and Interpretation. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* **2008**, *24*, 423–435. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Richard, E.A.; Fortier, G.D.; Lekeux, P.M.; Van Erck, E. Laboratory Findings in Respiratory Fluids of the Poorly-Performing Horse. *Vet. J.* **2010**, *185*, 115–122. [\[CrossRef\]](#)
35. Lavoie, J.-P.; Bullone, M.; Rodrigues, N.; Germim, P.; Albrecht, B.; Von Salis-Soglio, M. Effect of Different Doses of Inhaled Ciclesonide on Lung Function, Clinical Signs Related to Airflow Limitation and Serum Cortisol Levels in Horses with Experimentally Induced Mild to Severe Airway Obstruction. *Equine Vet. J.* **2019**, *51*, 779–786. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

36. Lane, J.G.; Bladon, B.; Little, D.R.M.; Naylor, J.R.J.; Franklin, S.H. Dynamic Obstructions of the Equine Upper Respiratory Tract. Part 1: Observations during High-Speed Treadmill Endoscopy of 600 Thoroughbred Racehorses. *Equine Vet. J.* **2010**, *38*, 393–399. [\[CrossRef\]](#)
37. Allen, K.; Franklin, S. Characteristics of Palatal Instability in Thoroughbred Racehorses and Their Association with the Development of Dorsal Displacement of the Soft Palate: Characteristics of Palatal Instability in Thoroughbred Racehorses. *Equine Vet. J.* **2013**, *45*, 454–459. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Courouge-Malblanc, A.; Deniau, V.; Rossignol, F.; Corde, R.; Leleu, C.; Maillard, K.; Pi, P.-H.; Pronost, S.; Fortier, G. Physiological Measurements and Prevalence of Lower Airway Diseases in Trotters with Dorsal Displacement of the Soft Palate. *Equine Vet. J.* **2010**, *42*, 246–255. [\[CrossRef\]](#)
39. Wysocka, B.; Kluciński, W. The Occurrence of Dynamic Structural Disorders in the Pharynx and Larynx, at Rest and during Exercise, in Horses Diagnosed with Mild and Moderate Equine Asthma (Inflammatory Airway Disease). *Pol. J. Vet. Sci.* **2018**, *21*, 203–211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Lo Feudo, C.M.; Stancari, G.; Collavo, F.; Stucchi, L.; Conturba, B.; Zucca, E.; Ferrucci, F. Upper and Lower Airways Evaluation and Its Relationship with Dynamic Upper Airway Obstruction in Racehorses. *Animals* **2022**, *12*, 1563. [\[CrossRef\]](#)
41. Davidson, E.J.; Harris, M.; Martin, B.B.; Nolen-Walston, R.; Boston, R.C.; Reef, V. Exercising Blood Gas Analysis, Dynamic Upper Respiratory Tract Obstruction, and Postexercising Bronchoalveolar Lavage Cytology—A Comparative Study in Poor Performing Horses. *J. Equine Vet. Sci.* **2011**, *31*, 475–480. [\[CrossRef\]](#)
42. Koblinger, K.; Nicol, J.; McDonald, K.; Wasko, A.; Logie, N.; Weiss, M.; Léguillette, R. Endoscopic Assessment of Airway Inflammation in Horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2011**, *25*, 1118–1126. [\[CrossRef\]](#)
43. Art, T.; Anderson, L.; Woakes, A.J.; Roberts, C.; Butler, P.J.; Snow, D.H.; Lekeux, P. Mechanics of Breathing during Strenuous Exercise in Thoroughbred Horses. *Respir. Physiol.* **1990**, *82*, 279–294. [\[CrossRef\]](#)
44. Mazan, M. Equine Exercise Physiology—Challenges to the Respiratory System. *Anim. Front. Rev. Mag. Anim. Agric.* **2022**, *12*, 15–24. [\[CrossRef\]](#)
45. Hinchcliff, K.W.; Kaneps, A.J.; Geor, R.J. *Equine Exercise Physiology: The Science of Exercise in the Athletic Horse*; Elsevier Health Sciences: Amsterdam, The Netherlands, 2008; ISBN 978-0-7020-2857-1.
46. Millares-Ramirez, E.M.; Lavoie, J. Bronchial Angiogenesis in Horses with Severe Asthma and Its Response to Corticosteroids. *J. Vet. Intern. Med.* **2021**, *35*, 2026–2034. [\[CrossRef\]](#)
47. Cook, W.R. A Hypothetical, Aetiological Relationship between the Horse's Bit, Nasopharyngeal Asphyxia and Negative Pressure Pulmonary Oedema: The Horse's Bit and Negative Pressure Pulmonary Oedema. *Equine Vet. Educ.* **2014**, *26*, 381–389. [\[CrossRef\]](#)
48. Gosker, H.R.; van Mameren, H.; van Dijk, P.J.; Engelen, M.P.K.J.; van der Vusse, G.J.; Wouters, E.F.M.; Schols, A.M.W.J. Skeletal Muscle Fibre-Type Shifting and Metabolic Profile in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Eur. Respir. J.* **2002**, *19*, 617–625. [\[CrossRef\]](#)
49. Gehlen, H.; Oey, L.; Rohn, K.; Bilzer, T.; Stadler, P. Pulmonary Dysfunction and Skeletal Muscle Changes in Horses with RAO. *J. Vet. Intern. Med.* **2008**, *22*, 1014–1021. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
50. Christley, R.M.; Hodgson, D.R.; Rose, R.J.; Hodgson, J.L.; Wood, J.L.N.; Reid, S.W.J. Coughing in Thoroughbred Racehorses: Risk Factors and Tracheal Endoscopic and Cytological Findings. *Vet. Rec.* **2001**, *148*, 99–104. [\[CrossRef\]](#)
51. Davis, K.U.; Sheats, M.K. Bronchoalveolar Lavage Cytology Characteristics and Seasonal Changes in a Herd of Pastured Teaching Horses. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 74. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Bond, S.L.; Timsit, E.; Workentine, M.; Alexander, T.; Léguillette, R. Upper and Lower Respiratory Tract Microbiota in Horses: Bacterial Communities Associated with Health and Mild Asthma (Inflammatory Airway Disease) and Effects of Dexamethasone. *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, 184. [\[CrossRef\]](#)

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.





Warszawa, 08.09.2025 r.

lek. wet. Natalia Kozłowska  
natalia\_kozłowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Pawliński, B., & Domino, M. (2023) Co-Occurrence of Severe Equine Asthma and Palatal Disorders in Privately Owned Pleasure Horses. Animals, 13(12), 1962* mój indywidualny wkład w jej powstaniu polegał na: opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metody badawczej, udziale w zapewnieniu zasobów i oprogramowania do realizacji badań, udziale w przeprowadzeniu badań, udziale w analizie danych, przechowywaniu danych, udziale w przygotowaniu wizualizacji, udziale w przygotowaniu szkic manuskryptu, udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu, zarządzaniu projektem oraz zapewnieniu finansowania projektu.

  
(Podpis)

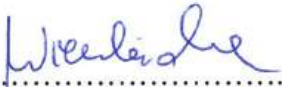
Warszawa, 08.09.2025 r.

Dr Małgorzata Wierzbicka  
malgorzata\_wierzbicka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Pawliński, B., & Domino, M. (2023) Co-Occurrence of Severe Equine Asthma and Palatal Disorders in Privately Owned Pleasure Horses. Animals, 13(12), 1962* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu metody badawczej, udziale w przeprowadzeniu badań, udziale w walidacji uzyskanych wyników oraz udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu.

  
.....  
(Podpis)

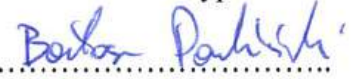
Warszawa, 08.09.2025 r.

Dr hab. Bartosz Pawliński, prof. uczelni  
bartosz\_pawlinski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Pawliński, B., & Domino, M. (2023) Co-Occurrence of Severe Equine Asthma and Palatal Disorders in Privately Owned Pleasure Horses. Animals, 13(12), 1962* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w zapewnieniu zasobów do realizacji badań, udziale w walidacji uzyskanych wyników oraz udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu.

  
.....  
(Podpis)

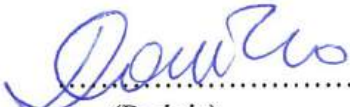
Warszawa, 08.09.2025 r.

Dr hab. Małgorzata Domino, prof. uczelni  
malgorzata\_domino@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Pawliński, B., & Domino, M. (2023) Co-Occurrence of Severe Equine Asthma and Palatal Disorders in Privately Owned Pleasure Horses. Animals, 13(12), 1962* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu metody badawczej, udziale w zapewnieniu oprogramowania do realizacji badań, udziale w analizie danych, udziale w przygotowaniu wizualizacji, udziale w przygotowaniu szkicu manuskryptu, udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu oraz nadzorowaniu pracy zespołu.

  
.....  
(Podpis)

## Article

# Co-Occurrence of Equine Asthma and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Pleasure Horses

Natalia Kozłowska , Małgorzata Wierzbicka, Tomasz Jasiński  and Małgorzata Domino \* 

Department of Large Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; natalia\_kozlowska@sggw.edu.pl (N.K.); malgorzata\_wierzbicka@sggw.edu.pl (M.W.); tomasz\_jasinski@sggw.edu.pl (T.J.)

\* Correspondence: malgorzata\_domino@sggw.edu.pl; Tel.: +48-532151876

**Abstract:** With the increasing awareness of the “united airway disease” theory, more horses, not only sport horses but also pleasure horses, undergo detailed examinations of the respiratory tract. Using endoscopy, equine asthma (EA) is most commonly diagnosed in the lower airway, while pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) is common in the upper airway. Grading EA as mild–moderate (MEA) and severe (SEA), this study aims to compare the co-occurrence and investigate the possible relationship between the clinical symptoms and endoscopic signs of MEA/SEA and PLH in pleasure horses. In this retrospective study, 80 out of 93 pleasure horses suspected of EA were enrolled and underwent a standardized protocol for a complete airway examination, including resting endoscopy with mucus accumulation assessment and cytology. The obtained results were scored and analyzed. In the studied pleasure horses, PLH co-occurred more frequently in horses with EA than without ( $p < 0.0001$ ) and more in horses with SEA than with MEA ( $p = 0.025$ ). However, when EA and PLH co-occurred, the severity of the clinical symptoms of EA did not increase ( $p > 0.05$ ). In both EA and PLH, the amount of tracheal and nasopharyngeal mucus increased with the severity of the disease; however, it was positively correlated ( $\rho = 0.33$ ;  $p = 0.02$ ) only in SEA horses. In conclusion, it is likely that EA is often accompanied by PLH; however, PLH did not play a role in increasing the severity of EA’s clinical symptoms. The role of the severity of accumulated mucus in the lower and upper airways when EA/PLH co-occur requires further research to confirm the morphological and functional unity of the respiratory tract, aligning with the concept of “united airways disease”.



**Citation:** Kozłowska, N.; Wierzbicka, M.; Jasiński, T.; Domino, M.

Co-Occurrence of Equine Asthma and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Pleasure Horses. *Agriculture* **2024**, *14*, 1157. <https://doi.org/10.3390/agriculture14071157>

Academic Editor: Mo Salman

Received: 30 June 2024

Revised: 12 July 2024

Accepted: 14 July 2024

Published: 16 July 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** asthma; pharynx; inflammation; airway diseases; equids

## 1. Introduction

In human medicine, the concept of unified airways has been developed, recognizing that the nature of inflammation in the upper and lower airways is usually the same [1]. The upper and lower airways are contiguous, sharing functional linkages and similar histological pictures [2]. Upper airway diseases, such as rhinitis, chronic rhinosinusitis, and nasal polyps, have been linked to concurrent lower airway disorders like asthma, chronic obstructive disease, cystic fibrosis, and obstructive sleep apnea [3–5]. A similar link has been postulated in equine medicine [6–13], predominantly between equine asthma (EA) and various lower and upper airway diseases. EA is the most common equine lower airway disease associated with an increase in the negative pressure in the airways due to chronic airway inflammation, bronchospasm, excessive mucus secretion, and airway remodeling [14]. EA is graded based on clinical severity from mild–moderate equine asthma (MEA) to severe equine asthma (SEA) [14]. It is estimated that MEA affects approximately 68–77% of the pleasure horse population in the northern hemisphere, while SEA affects up to 14–17% [14]. In racehorses, bronchoalveolar lavage fluid (BALf) cytology revealed evidence of MEA in 80% of examined horses [15,16]. However, MEA-affected horses often do not show clinical symptoms of lower airway disease [17], leading to underdiagnosis until EA exacerbation or the accumulation of signs from another airway disorder.

Accumulating evidence has revealed links between MEA and exercise-induced pulmonary hemorrhage (EIPH) as well as between EIPH and upper airway obstruction (UAO). In both cases, negative pressure in the airways creates a risk of disruption of the alveolar-capillary membrane [12], similar to cases of UAO and negative pressure pulmonary edema (NPPE) [18] in humans. Moreover, in horses with concurrent MEA and EIPH, asthmatic inflammation and bronchoconstriction increase intrapleural pressure, leading to bleeding. However, EIPH can occur regardless of whether UAO or EA is present [13]. EA has also been linked with the occurrence of palatal disorders (PD), such as palatal instability (PI) and dorsal displacement of soft palate (DDSP) [6,7]. Both MEA and SEA have been reported as one of the factors exacerbating or causing DDSP [6]. In pleasure horses with PI and concurrent SEA, PI may resolve after the inflammation of lower airways has been treated [7]. Also, in sport horses with concurrent PI and MEA, as well as those with nasopharyngeal collapse and MEA, a similar outcome after anti-inflammatory treatment has been reported [11]. The exact basis of this connection is still not fully understood; however, the impact of increased negative pressure due to lower respiratory tract obstruction and the spreading of the inflammatory process is suspected [6]. Therefore, pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH), another inflammatory disease of the upper airways, and its co-occurrence with EA is of interest to equine practitioners [19,20]. PLH is characterized by the inflammation of local lymphoid tissue in the nasopharyngeal region [21], with an etiology involving the exposure to various irritants, allergens, and viral or bacterial agents [22]. PLH has been shown to predispose horses to UAO, including DDSP, nasopharyngeal collapse, aryepiglottic fold, and nasopharyngeal collapse [23]. The reason for this link is believed to be neural inflammation of the pharyngeal branch of the vagus nerve, leading to the neuromuscular dysfunction of the upper airway and increased negative pressure in the lower airway [24].

PLH is graded based on the clinical symptoms and endoscopic appearance of the nasopharyngeal mucosa from 0, indicating no signs of PLH, to 4, indicating severe PLH [21]. In young horses up to 5 years old, PLH is a common, self-limiting condition [22]. Saulez et al. reported grade 2–4 PLH in 63% of thoroughbred horses, noting that in young horses (3 vs. 4 years old), grade 3–4 PLH prevailed [25]. Hobo et al. revealed grade 3–4 PLH in 37% of 2-year-old thoroughbred racehorses; this decreased to nearly 0% in horses > 6 years [26]. Importantly, in young horses, PLH overlaps in time with the onset of training and performance career [22]. Many authors believe that the grade of PLH does not affect horse performance [19,25,26], although affected individuals may show clinical symptoms of airway disease. Clinical symptoms, also seen in older horses over 5 years of age, include abnormal respiratory sounds, coughing, and epistaxis [22], while endoscopically, the extent of pharyngeal follicular hyperplasia and the nasopharyngeal mucus quantity in the nasopharyngeal region are evaluated [20]. As clinical symptoms are non-specific and may accompany many airway diseases [25], a detailed examination of the entire respiratory tract, including resting endoscopy, is needed for an accurate differential diagnosis. As a resting endoscopy with tracheal mucus evaluation and BALf cytology is a ‘golden standard’ for the diagnosis of EA [17], the endoscopic signs of PLH and EA can be assessed during the same examination.

Therefore, this study aims to investigate the possible relationship between the endoscopic signs of two common diseases of the upper and lower airways in pleasure horses, considering PLH and EA. We hypothesize that (1) PLH co-occurs more frequently in horses with EA than without and with SEA than with MEA; (2) when EA and PLH co-occur, the severity of clinical symptoms of EA increases with the grade of PLH; (3) when EA and PLH co-occur, the amount of tracheal and nasopharyngeal mucus accumulation is related.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Horses

A prospective observational study enrolled ninety-three ( $n = 93$ ) horses suspected of EA. All studied horses were privately owned clinical patients, used for pleasure (did not participate in sports competitions) at the preliminary level of training (working under



saddle in walk, trot, and canter). Details regarding the environment were obtained in the form of a survey answered by the owners. Feeding regimen, housing type, stable ventilation, stable cleaning, hay and straw storage, and access to the paddock were considered.

Owners provided written consent for the horse's inclusion in the study. Horses were examined from July 2020 to April 2024 by the field services of the Equine Clinic at Warsaw University of Life Sciences. Inclusion criteria included a history of suspected EA, while exclusion criteria included treatment with corticosteroids, bronchodilators, antibiotics, and/or allergen immunotherapy within four weeks before the examination. Twelve horses were excluded due to the administration of corticosteroids (7 horses), antibiotics (3 horses), and bronchodilators (2 horses), resulting in a final study group of eighty-one horses ( $n = 81$ ). All horses underwent a standardized protocol for a complete airway examination, including a detailed respiratory tract examination, resting airway endoscopy, tracheal wash (TW) cytology, and BALf cytology. The entire examination protocol comprised standard diagnostic tests performed as a part of veterinary clinical examinations. Based on the results, the horses were classified as diseased (EA studied group;  $n = 71$ ) and healthy (EA-free control group;  $n = 10$ ), as described in Section 3.

## 2.2. Detailed Respiratory Tract Examination and Resting Endoscopy

A detailed respiratory tract examination was performed and quantified using the modified score system [7], which allows for the scoring of clinical symptoms such as respiratory rate, nasal discharge, tracheal and thoracic auscultation, nasal flare, cough, and abdominal lift. As a numerical result of a detailed respiratory tract examination, each horse was characterized by a sum of clinical scores, as shown in Table 1. The scores were assigned by two independent clinicians.

**Table 1.** Clinical symptoms scored based on the detailed respiratory tract examination.

| Clinical Signs        | Descriptor                                                       | Score |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------|-------|
| Respiratory rate      | <16                                                              | 0     |
|                       | 17–20                                                            | 1     |
|                       | 21–30                                                            | 2     |
|                       | >30                                                              | 3     |
| Nasal discharge       | none                                                             | 0     |
|                       | serous                                                           | 1     |
|                       | mucopurulent/epistaxis                                           | 2     |
| Tracheal auscultation | normal tracheal sounds                                           | 0     |
|                       | slight increase                                                  | 1     |
|                       | clearly audible increased                                        | 2     |
|                       | crackles and wheezing present                                    | 3     |
| Thorax auscultation   | normal pulmonary sounds                                          | 0     |
|                       | slight increased pulmonary sounds                                | 1     |
|                       | clearly audible increased pulmonary sounds                       | 2     |
|                       | crackles and wheezing present                                    | 3     |
| Nostril flare         | none                                                             | 0     |
|                       | present                                                          | 1     |
| Cough score           | none                                                             | 0     |
|                       | coughs at specific times of day (feeding/exercising/making beds) | 1     |
|                       | frequent cough                                                   | 2     |
| Abdominal lift        | none                                                             | 0     |
|                       | slight flattening of ventral flank                               | 1     |
|                       | obvious abdominal lift and “heave line”                          | 2     |
| Maximum score         |                                                                  | 16    |

Resting endoscopy was performed following the international guidelines [27,28] using a flexible video bronchoscope (8 × 2000 mm, Karl Storz, Berlin, Germany). Horses were sedated with detomidine hydrochloride (Domosedan; Orion Corporation, Espoo, Finland; 0.01 mg/kg b.w i.v.) and butorphanol (Torbugesic; Zoetis Polska Sp. z o.o., Warsaw, Poland; 0.01 mg/kg b.w i.v.), with doses determined based on the horse's body weight.

The nasopharynx, larynx, trachea, and tracheal septum were visually examined. The nasopharynx mucus was assessed quantitatively by visual evaluation, whereas the tracheal mucus was assessed quantitatively and qualitatively by visual evaluation and cytology. The scoring of both quantitative assessments is described in Sections 2.4 and 2.5.

### 2.3. Tracheal Wash and Bronchoalveolar Lavage Fluid

TW and BALf were collected following a standardized protocol [29]. TW was collected using a sterile polytetrafluoroethylene catheter (KRUUSE, Langeskov, Denmark) passed through the working channel of the endoscope into the trachea. Sterile normal saline (30 mL; 0.9% NaCl; Baxter, Warsaw, Poland) was infused into the trachea, and a sample was collected from the tracheal puddle. The TW sample was placed in EDTA tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) for cytology (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

The BALf protocol was then performed after infusing 20 mL of lidocaine solution (Lidor 20 mg/mL, Richter Pharma, Wels, Austria) into the tracheal septum area. BALf was collected using a determined catheter (KRUUSE, Langeskov, Denmark) wedged into a bronchus. Sterile normal saline (250 mL; 0.9% NaCl; Baxter, Warsaw, Poland) was infused into the bronchus and aspirated immediately. The BALf sample was placed in EDTA tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) for cytology.

The TW and BALF samples were centrifuged ( $300 \times g$  for 10 min). The supernatant was decanted, and the pellet was smeared on the slide. The smears were dried, fixated using Cytotfix (Samko, Warsaw, Poland), and sent to the commercial veterinary laboratory (Laboklin Laboratory, Warsaw, Poland) for cytology.

### 2.4. Classification of Equine Asthma

The presence and severity of EA were assessed using the EA scores described in Table 2 in connection with the clinical scores. The TW and BALf samples were qualitatively assessed using neutrophil percentages following Couëttil et al. [17]. Based on the TW and BALf neutrophil percentage, horses were assigned into one of three categories: (1) normal TW: <20% neutrophils and normal BALf: <5% neutrophils; (2) moderate inflammation in TW: >20%; ≤60% and in BALf: >5%; ≤20% neutrophils; and (3) severe inflammation in TW: >60% and in BALf: >20% neutrophils [17].

**Table 2.** Scoring of EA based on the clinical signs, endoscopic signs, and cytology of TW and BALf.

| Endoscopic Signs              | Descriptor                                        | Score |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|-------|
| Neutrophil percentage in BALf | <5%                                               | 0     |
|                               | 5–20                                              | 1     |
|                               | 20–60%                                            | 2     |
|                               | >60%                                              | 3     |
| Neutrophil percentage in TW   | <20%                                              | 0     |
|                               | 20–60%                                            | 1     |
|                               | >60%                                              | 2     |
| Tracheal mucus accumulation   | None                                              | 0     |
|                               | little, multiple small blobs                      | 1     |
|                               | moderate, larger blobs                            | 2     |
|                               | confluent or stream-forming thick white to yellow | 3     |
|                               | pool forming mucus                                | 4     |
|                               | profuse amounts of mucus                          | 5     |

EA was confirmed when the neutrophil percentage exceeded >5%, and the horse was assigned to category 2 or 3. Horses assigned to category 1 were classified as EA-free. Next, for the classification of EA severity, the clinical staging sheet developed by Tilley et al. [30] was used and scored, as shown in Table 1. Based on clinical symptom scoring, horses with confirmed EA (TW/BALf categories 2 and 3) were classified as MEA or SEA.



MEA was recognized when the clinical symptom score was  $\leq 4$  points and BALf neutrophil percentage was  $<60\%$ . SEA was recognized when the clinical symptom score was  $>4$  points, and BALf neutrophil percentage was  $>60\%$ .

Additionally, tracheal mucus accumulation was quantitatively assessed using on a 0–5 point scale following Gerber et al. [27,31] (Table 2).

### 2.5. Classification of Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia

The presence and grade of PLH were assessed using a visual assessment of the nasopharyngeal mucosa using a 0–4 points PLH scale following Holcombe et al. [22] (Table 3). Based on the PLH scale, horses were classified as PLH-free (grade 0), grade 1 PLH, grade 2 PLH, grade 3 PLH, or grade 4 PLH, as shown in Figure 1. Additionally, the nasopharyngeal mucus was quantitatively assessed using a modified 0–3 points scale following Koblinger et al. [20] (Table 3).

**Table 3.** Scoring of PLH based on the endoscopic signs.

| Endoscopic Signs                  | Descriptor                                                                  | Scores |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|--------|
| Nasopharyngeal mucosa             | no visible lymphoid tissue                                                  | 0      |
|                                   | few small white follicles over the dorsal wall                              | 1      |
|                                   | numerous small follicles on the dorsal and lateral nasopharyngeal wall      | 2      |
|                                   | hyperemic follicles over the entire dorsal and lateral wall                 | 3      |
|                                   | large edematous hyperemic follicles coalesce broad-based polypoid aggregate | 4      |
| Nasopharyngeal mucus accumulation | no visible mucus                                                            | 0      |
|                                   | little blobs of mucus presented ventrally and abaxially to the epiglottis   | 1      |
|                                   | confluent mucus presented ventrally and dorsally to the epiglottis          | 2      |
|                                   | large amount of dense mucus                                                 | 3      |



**Figure 1.** Sample images of endoscopic signs classified as grade 0 (free from pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH); no PLH) and grades 1–4 (PLH). (A) Grade 0 PLH; (B) Grade 1 PLH; (C) Grade 2 PLH; (D) Grade 3 PLH; (E) Grade 4 PLH.

### 2.6. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), with the level of significance set at  $p < 0.05$ .

#### 2.6.1. Descriptive Statistics

Descriptive statistics (number of horses classified as EA-free, MEA, and SEA; number of horses as classified as grades 0–4 PLH; percentage of horses showing evidence of the studied environmental descriptors) were used for the characterization of the collected data. The age of horses in each group was presented using ranges (minimum and maximum age) and the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Then, data series were tested for normality using the Shapiro–Wilk test. Since the data were not normally distributed, non-parametric tests were selected for further comparisons and the plot results were presented using the medians, interquartile ranges, and minimum and maximum values.

### 2.6.2. Co-Occurrence of EA with PLH

The co-occurrence of EA with PLH in pleasure horses was compared using a Chi-square test. Data were presented in consecutive rows as the number of horses classified in grade 0–4 PLH for EA-free, MEA, and SEA groups separately, and then compared between EA-free, MEA, and SEA groups and next between MEA and SEA groups. The number of horses was supported by the percentage in relation to group size and total sample size, respectively.

### 2.6.3. Severity of Clinical Symptoms

Clinical symptom scores were compared using the Mann–Whitney test between MEA and SEA groups. Then, each group was subdivided into grade 0–3 PLH subgroups and compared between PLH grades using the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn’s multiple comparisons test.

### 2.6.4. Tracheal and Nasopharyngeal Mucus Accumulation

As different scales were used to assess tracheal and nasopharyngeal mucus accumulation (0–5 points and 0–3 points, respectively), data were normalized using a standardization protocol before comparison. A standardized amount of mucus was compared between locations (trachea, nasopharyngeal area) using the Wilcoxon–Signed–Rank test. Next, for each location, a standardized amount of mucus was compared between EA-related groups and PLH-related groups, separately. The Kruskal–Wallis test, followed by Dunn’s multiple comparisons test, was used. Then, Spearman’s rank correlation coefficient ( $\rho$ ) was calculated between a standardized amount of tracheal mucus and nasopharyngeal mucus for each EA-related and PLH-related pair of data series. Correlations were considered significant for  $p < 0.05$ .

### 2.6.5. Correlations with Age and Environmental Descriptors

The Spearman’s rank correlation coefficient ( $\rho$ ) was calculated between disease classifiers (clinical symptoms scores; EA presence and severity; PLH grades; tracheal mucus scores; nasopharyngeal mucus scores) and age and environmental descriptors (feeding regimen, housing type, stable ventilation, stable cleaning, hay and straw storage, and access to the paddock). Correlations were considered significant for  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Descriptive Statistics Results

This study enrolled thirty-six mares and forty-five geldings of different breeds (fifty Polish Half-Bred horses, ten Thoroughbreds, four Silesian horses, three Arabian horses, three Belgian horses, two Hanoverian horses, two Hucul horses, two Konik Polski horses, two Tinkers, two Welsh ponies, and one Fiord), aged between 4 and 26 years (mean  $\pm$  SD:  $12.9 \pm 4.6$ ).

Considering EA occurrence and severity classification, ten horses (seven mares and three geldings, aged between 7 and 17 years (mean  $\pm$  SD:  $10.9 \pm 3.6$ )) were classified as EA-free; twenty-three horses (seven mares and sixteen geldings, aged between 4 and 19 years (mean  $\pm$  SD:  $11.2 \pm 3.8$ )) were classified as MEA; whereas, forty-eight horses (twenty-two mares and twenty-six geldings, aged between 4 and 26 years (mean  $\pm$  SD:  $14.1 \pm 4.7$ )) were classified as SEA.

Considering PLH occurrence and severity classification, eight horses (four mares and four geldings, aged between 8 and 17 years (mean  $\pm$  SD:  $11.6 \pm 3.2$ )) were classified as grade 0 (PLH-free); twenty-three horses (twelve mares and eleven geldings, aged between 7 and 17 years (mean  $\pm$  SD:  $14.0 \pm 4.8$ )) were classified as grade 1; thirty horses (eleven mares and nineteen geldings, aged between 6 and 26 years (mean  $\pm$  SD:  $12.8 \pm 5.0$ )) were classified as grade 2; nineteen horses (eight mares and eleven geldings; aged between 4 and 20 years (mean  $\pm$  SD:  $12.5 \pm 3.6$ )) were classified as grade 3; and one horse (mare; age

4 years) was classified as grade 4. Because only one horse was classified as grade 4 PLH, further statistical analysis was performed on 80 horses ranging from grade 0 to 3 PLH.

The percentage of horses showing evidence of the studied environmental descriptors was as follows. Considering the feeding regimen, 65.4% of the studied horses were fed hay and concentrates, 12.3% of horses were fed soaked hay and concentrates, 7.4% of horses were fed only hay, and 14.8% of horses were fed only soaked hay. Among the types of housing, 18.5% of studied horses were housed in stables with boxes with access to the outside or with a window, 16.0% of horses were housed in the free-range stable, and 65.4% of horses were housed in stables with boxes with access to the corridor. Stable ventilation in 39.5% of the stables was very good; in 34.6% of the stables, it was good; in 22.2% of the stables, it was poor; and in 3.7% of the stables, it was bad. In the case of free-range housing, the ventilation was always assessed as very good. Given the stable cleaning, 4.9% of stables were cleaned more often than twice a day, 60.5% of stables were cleaned twice a day, 19.8% of stables were cleaned once a day, and 14.8% of stables were cleaned less than once a day. In 66.7% of the stables, hay and straw were stored in a building outside the stable, 18.5% in the stable in a separate box/storage space, and 14.8% in the stable in the attic. All studied horses had daily access to the paddock, including 51.9% of horses to grassy pasture and 48.1% of horses to the sandy paddock.

### 3.2. Co-Occurrence of EA with PLH

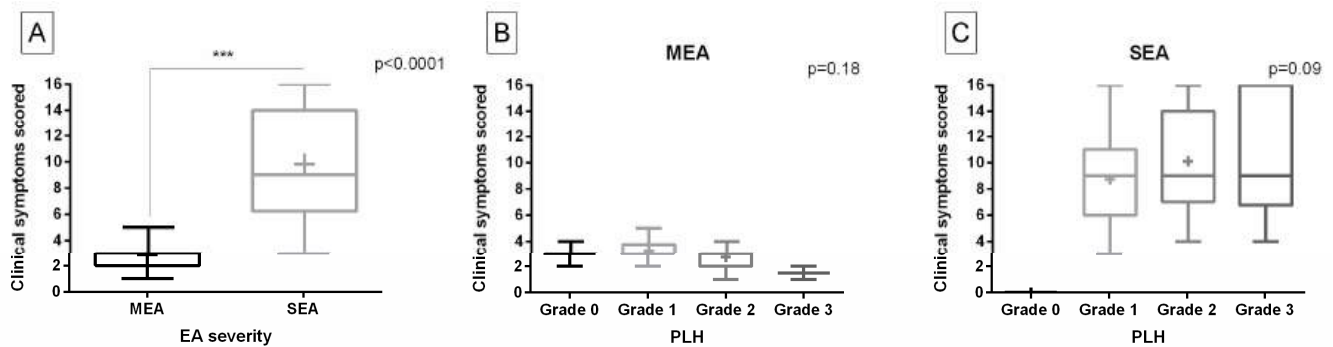
In EA-free horses, no PLH (grade 0) was found in six horses (60.0%) and grade 1 PLH in four horses (40.0%), whereas no horses with grade 2 and 3 PLH were found. In MEA horses, no PLH (grade 0) was found in two horses (8.7%), grade 1 PLH in eight horses (34.8%), grade 2 PLH in eleven horses (47.8%), and grade 3 also in two horses (8.7%). In SEA horses, grade 1 PLH was found in 11 horses (23.4%), grade 2 PLH in 19 horses (40.4%), and grade 3 in 17 horses (36.2%); so that all horses with SEA showed endoscopic signs of PLH. Comparing the pattern of PLH occurrence between EA-related groups, PLH appeared more frequently in EA horses than EA-free horses ( $p < 0.0001$ ), as well as with SEA than with MEA ( $p = 0.025$ ) (Table 4).

**Table 4.** The co-occurrence of equine asthma (EA; including EA-free, mild–moderate equine asthma (MEA), severe equine asthma (SEA) horses) with pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH; including grades 0–3) in horses before and after severe equine asthma.

| EA                                             |         | EA-Free          | MEA                                   | SEA               | Total           |
|------------------------------------------------|---------|------------------|---------------------------------------|-------------------|-----------------|
| PLH                                            | Grade 0 | 6 (60.0%; 7.5%)  | 2 (8.7%; 2.5%)                        | 0                 | 8 (10.0%)       |
|                                                | Grade 1 | 4 (40.0%; 5.0%)  | 8 (34.8%; 10.0%)                      | 11 (23.4%; 13.8%) | 23 (28.8%)      |
|                                                | Grade 2 | 0                | 11 (47.8%; 13.8%)                     | 19 (40.4%; 23.8%) | 30 (37.5%)      |
|                                                | Grade 3 | 0                | 2 (8.7%; 2.5%)                        | 17 (36.2%; 21.3%) | 19 (23.8%)      |
| Total                                          |         | 10 (100%; 12.5%) | 23 (100%; 28.8%)                      | 47 (100%; 58.8%)  | 80 (100%; 100%) |
| EA-free/MEA/SEA: Chi-square test; $p < 0.0001$ |         |                  | MEA/SEA: Chi-square test; $p = 0.025$ |                   |                 |

### 3.3. Severity of Clinical Symptoms

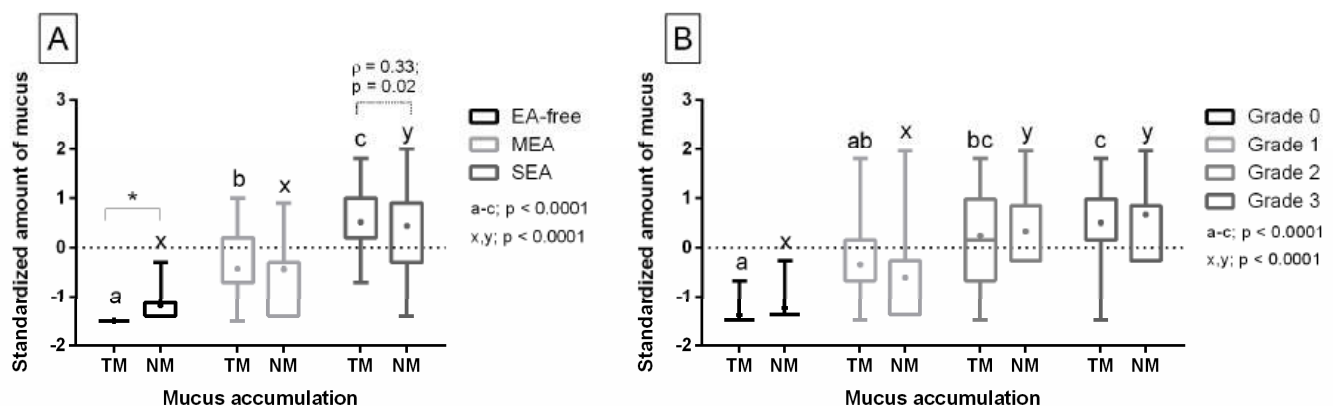
In horses with confirmed EA, the severity of clinical symptoms reflected by the clinical symptoms scores was significantly higher in SEA than in MEA horses (Figure 2A;  $p < 0.0001$ ). Therefore, the PLH grade-related differences were compared in SEA and MEA groups, separately. However, in both groups MEA (Figure 2B;  $p = 0.16$ ) and SEA (Figure 2C;  $p = 0.09$ ) groups, there were no differences in the severity of clinical symptoms between grades of PLH.



**Figure 2.** Severity of clinical symptoms of respiratory tract diseases compared considering (A) equine asthma (EA) severity (mild–moderate equine asthma (MEA), severe equine asthma (SEA)) and considering pharyngeal lymphoid hyperplasia grades (PLH; including grades 0–3) within (B) MEA and (C) SEA groups, respectively. Data on box plots are represented by lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. Additionally, the mean values are marked by “+”. Asterisks indicate differences between groups for  $p < 0.05$  (\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

### 3.4. Tracheal and Nasopharyngeal Mucus Accumulation

In EA-free horses, the amount of mucus was higher in the nasopharyngeal area than in the trachea ( $p = 0.002$ ); however, no differences between locations were noted in MEA ( $p = 0.77$ ) and SEA ( $p = 0.34$ ) horses. In only SEA horses, the weak positive significant correlation ( $\rho = 0.33$ ;  $p = 0.02$ ) was found between tracheal and nasopharyngeal mucus amounts. In the trachea, the amount of mucus was low in EA-free horses, higher in MEA horses, and highest in SEA horses ( $p < 0.0001$ ). Whereas in the nasopharyngeal area, the amount of mucus was low in EA-free and MEA horses and higher in SEA horses ( $p < 0.0001$ ) (Figure 3A).



**Figure 3.** Standardized amount of tracheal mucus (TM) and nasopharyngeal mucus (NM) compared considering (A) equine asthma (EA) presence and severity (EA-free, mild–moderate equine asthma (MEA), severe equine asthma (SEA)) and considering (B) pharyngeal lymphoid hyperplasia grades (PLH; including grades 0–3). Data on box plots are represented by lower quartile, median, and upper quartile, whereas whiskers represent minimum and maximum values. Additionally, the mean values are marked by “+”. Asterisks indicate differences between TM and NM for  $p < 0.05$  (\*,  $p < 0.01$ );  $\rho$  and  $p$  indicate significant Spearman correlations between TM and NM for  $p < 0.05$ ; and lowercase letters indicate differences between EA-related or PLH-related groups for  $p < 0.05$ .

In PLH horses, the amount of mucus did not differ between locations regardless of PLH grades ( $p > 0.05$ ), and no significant correlations were found ( $p > 0.05$ ), respectively. Both in the trachea ( $p < 0.0001$ ) and nasopharyngeal area ( $p < 0.0001$ ), the amount of mucus was low in PLH-free horses (grade 0) and higher in grade 2–3 PLH horses. Moreover, the amount of tracheal mucus did not differ between grades 0 and 1 as well as grades 1 and 2,

whereas the amount of nasopharyngeal mucus did not differ between grades 0 and 1 as well as grades 2 and 3 (Figure 3B).

### 3.5. Correlations with Age and Environmental Descriptors

Weak positive correlations were found between the horse's age and clinical symptom scores ( $\rho = 0.32$ ;  $p = 0.004$ ); EA presence and severity ( $\rho = 0.32$ ;  $p = 0.004$ ), and amount of tracheal mucus ( $\rho = 0.26$ ;  $p = 0.01$ ). Considering environmental descriptors, clinical symptom scores were weakly negatively correlated with a feeding regimen with only soaked hay ( $\rho = -0.32$ ;  $p = 0.003$ ) as well as weakly positively correlated with bad ventilation in the stable ( $\rho = 0.27$ ;  $p = 0.01$ ) and cleaning the stable less than one a day ( $\rho = 0.31$ ;  $p = 0.005$ ). The presence and severity of EA were weakly and negatively correlated with only a feeding regimen with only soaked hay ( $\rho = -0.40$ ;  $p = 0.002$ ). PLH grades weakly negatively correlated with a feeding regimen with only soaked hay ( $\rho = -0.33$ ;  $p = 0.003$ ), housing in boxes with access to the outside or with a window ( $\rho = -0.24$ ;  $p = 0.03$ ), cleaning the stable twice a day ( $\rho = -0.26$ ;  $p = 0.02$ ), and storage of hay and straw in building outside the stable ( $\rho = -0.24$ ;  $p = 0.03$ ). The amount of tracheal mucus was weakly negatively correlated with the feeding regimen with only soaked hay ( $\rho = -0.29$ ;  $p = 0.007$ ) and weakly positively correlated with bad ventilation in the stable ( $\rho = 0.28$ ;  $p = 0.01$ ). Weak negative correlations were found between the amount of nasopharyngeal mucus and feeding regimen with only soaked hay ( $\rho = -0.26$ ;  $p = 0.02$ ), in boxes with access to the outside or with a window ( $\rho = -0.23$ ;  $p = 0.04$ ), very good ( $\rho = -0.19$ ;  $p = 0.04$ ) and good ( $\rho = -0.24$ ;  $p = 0.03$ ) stable ventilation, cleaning the stable twice a day ( $\rho = -0.25$ ;  $p = 0.01$ ), as well as storage of hay and straw in building outside the stable ( $\rho = -0.23$ ;  $p = 0.04$ ). Moreover, weak positive correlations were noted between the amount of nasopharyngeal mucus and cleaning the stable less than once a day ( $\rho = 0.30$ ;  $p = 0.007$ ) as well as storage of hay and straw in the stable in the attic ( $\rho = 0.23$ ;  $p = 0.04$ ) (Table 5).

**Table 5.** Spearman correlation coefficients ( $\rho$ ) between disease classifiers (clinical symptoms scores; equine asthma (EA) presence and severity; pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) grades; tracheal mucus (TM) scores; nasopharyngeal mucus (NM) scores) and age and environmental descriptors (feeding regimen, housing type, stable ventilation, stable cleaning, hay and straw storage, and access to the paddock);  $p$  was provided when  $p < 0.05$ .

| Age and Environment         | Detail Descriptors                      | Clinical Symptoms            | EA                           | PLH                          | TM                           | NM                          |
|-----------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Age                         |                                         | $\rho = 0.32$ ; $p = 0.004$  | $\rho = 0.32$ ; $p = 0.004$  | -                            | $\rho = 0.26$ ; $p = 0.01$   | -                           |
| Feeding regimen             | hay and concentrates                    | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
|                             | soaked hay and concentrates             | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
|                             | only hay                                | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
|                             | only soaked hay                         | $\rho = -0.32$ ; $p = 0.003$ | $\rho = -0.40$ ; $p = 0.002$ | $\rho = -0.33$ ; $p = 0.003$ | $\rho = -0.29$ ; $p = 0.007$ | $\rho = -0.26$ ; $p = 0.02$ |
| Housing type                | boxes & outside or window               | -                            | -                            | $\rho = -0.24$ ; $p = 0.03$  | -                            | $\rho = -0.23$ ; $p = 0.04$ |
|                             | boxes & corridor                        | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
|                             | free-range stable                       | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
| Stable ventilation          | very good                               | -                            | -                            | -                            | -                            | $\rho = -0.19$ ; $p = 0.04$ |
|                             | good                                    | -                            | -                            | -                            | -                            | $\rho = -0.24$ ; $p = 0.03$ |
|                             | poor                                    | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
|                             | bad                                     | $\rho = 0.27$ ; $p = 0.01$   | -                            | -                            | $\rho = 0.28$ ; $p = 0.01$   | -                           |
| Stable cleaning             | >twice a day                            | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
|                             | twice a day                             | -                            | -                            | $\rho = -0.26$ ; $p = 0.02$  | -                            | $\rho = -0.25$ ; $p = 0.01$ |
|                             | once a day                              | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
|                             | <once a day                             | $\rho = 0.31$ ; $p = 0.005$  | -                            | -                            | -                            | $\rho = 0.30$ ; $p = 0.007$ |
| Hay and straw storage       | building outside the stable             | -                            | -                            | $\rho = -0.24$ ; $p = 0.03$  | -                            | $\rho = -0.23$ ; $p = 0.04$ |
|                             | in stable in separate box/storage space | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
|                             | in stable in the attic                  | -                            | -                            | -                            | -                            | $\rho = 0.23$ ; $p = 0.04$  |
|                             |                                         |                              |                              |                              |                              |                             |
| Daily access to the paddock | grassy pasture                          | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |
|                             | sandy paddock                           | -                            | -                            | -                            | -                            | -                           |

#### 4. Discussion

In the concept of a unified airway, each respiratory tract disease should be considered in a broader spectrum due to the possible presence of concurrent linkage disease. Widely, EA has been investigated to interfere with upper airway diseases [6,23]. In this study, we revealed a higher prevalence of PLH in horses with EA than in EA-free horses. Interestingly, the grade of PLH was not associated with the severity of EA symptoms; however, PLH appeared in all horses with SEA. This co-occurrence remains not fully determined; however, one may suggest the spreading of the inflammatory process occurred via the continuous airway epithelium and an increased reaction of pharyngeal lymphoid tissue as a result of asthma triggers, especially during the onset of symptoms exacerbation.

EA is a progressive condition with respiratory distress becoming more severe over the years [14], which is in agreement with our study, where clinical signs were positively correlated with a horse's age. However, we cannot support the higher incidence of PLH in young horses < 5 years old [21,25,26] considering an older range group in our study. It is generally accepted that PLH results from exposure to environmental and infectious airborne antigens, while EA exacerbation occurs after exposure to the specific asthma triggers in predisposed individuals, such as the organic components of dust [22]. The role of infectious agents in EA pathogenesis needs further investigation. However, our study supports the environmental impact [28,32]. We reported more severe clinical signs of EA associated with poor ventilation and infrequent stable cleaning. Horses fed with soaked hay expressed fewer clinical signs; however, in those fed with soaked hay and concentrates, no direct correlation was found. It could be due to the low number of horses in that feed regimen, or it may suggest the impact of concentrate quality. It was already reported that the hygienic status of concentrates plays a role in maintaining proper equine respiratory tract health, as ventilation does not remove the dust challenge from horse nostrils when the animal is eating or sniffing [33]. Intemann et al. showed that concentrates play an important role in the emission of airborne allergens and have mold counts enough to induce coughing [34]. On the other hand Vandenput et al. [35] indicated that concentrates play a minor role as a source of aeroallergens in dust since the emission of dust is low. However, the association is still suggested.

Similarly, we found a positive correlation between PLH grade and (1) feeding with soaked hay and concentrates, (2) keeping in outside boxes, (3) frequent cleaning of the stable, and (4) outside storage of the bedding. We suggest that dust components are capable of initiating PLH, although opinions among researchers are still divided. Bagshaw et al. showed that racetrack location and race day quality index were associated with PLH severity in thoroughbred racehorses of all ages [36]. In contrast, Clarke et al. found no association between poor stable environments and PLH in 2-year-old horses [37].

Bacterial or viral infections of the respiratory tract may be linked to both PLH and EA; however, recent opinions are still divided [14]. Van Cleemput et al. showed that dust-derived proteases might disrupt airway epithelium integrity, leading to an increased infection rate of epithelial cells by equine herpesvirus type 1 (EHV-1) [38]. This is in agreement with Cook [39] and Blakeslee et al. [40], who confirmed the correlation between equine herpesvirus type 2 (EHV-2) detection and neutrophilia in tracheal wash, and Clarke et al. [37] who suggested PLH as a sequel to viral infection.

Similarly, the composition of the lower respiratory tract microbiota was associated with EA pathogenesis in young racehorses [37,38], while in older horses, this association has not been supported [8]. Lo Feudo et al. [8,23] reported that MEA horses were more positive for bacterial culture compared to the SEA horses, suggesting the same age-related association linked to the development of immunity. Interestingly, no association between PLH and bacterial culture was reported by present reports.

Both EA and PLH are associated with UAO diseases. In EA, bronchoconstriction, mucus accumulation, and airway remodeling lead to an increase in negative pressure [14]. The laryngeal mucosa is abundant in negative pressure receptors that are stimulated during obstruction and provide afferent information to the central nervous system, signaling the



contraction of upper airway muscles that ultimately leads to the dilation and stabilization of the upper airway [41]. In the pharyngeal mucosa, mechanoreceptors of the pharyngeal branch of the vagus nerve are present and play a role in maintaining normal nasopharyngeal function [24].

It has been suggested that inflammation in this region may predispose horses to nasopharyngeal collapse, dorsal displacement of the soft palate, and aryepiglottic fold collapse [24,28]. Inflammatory follicles on the pharyngeal wall decrease airway size, potentially increasing negative pressure during inspiration, which results in the dorsal wall of the pharynx being pulled down and the soft palate being elevated [42]. Thus, if EA and PLH commonly co-occur, they may both play a role in the pathophysiology of UAO. Additionally, the incidence of PLH and some dynamic upper nasopharyngeal diseases appears to decrease as the horse ages [22].

The appearance of pharyngeal wall follicles varies between horses and may suggest the character of the inflammatory process, which may be acute or chronic. Red and edematous follicles indicate acute inflammation, while firm, white, and fibrotic follicles suggest a chronic process [42]. In our study, chronic pharyngeal follicles dominated, suggesting that the process might not be incidental.

Tracheal mucus accumulation correlates with clinical signs [43], cough, cytological indicators of airway inflammation [27], and poor performance [19]. Production of tracheal mucus can be initiated by inflammation or directly by irritants, including bacteria, viruses, and environmental contaminants. Variations in tracheal grades are observed in individuals depending on age, airway status, or even weather conditions, such as temperature and humidity [32,44,45]. In our study, there was no correlation between housing conditions and mucus accumulation. Only weak positive and weak negative correlations were found between the mucus score and bad ventilation and soaked hay feed regimen, respectively. This is in agreement with Koblinger et al., who found no association between housing conditions and mucus score [20].

Interestingly, in this study, we found a wide association between environmental conditions and nasopharyngeal mucus accumulation. To date, this hypothetical relationship has not been studied in a horse. We reported weak negative correlations between the amount of nasopharyngeal mucus and feeding regimen with only soaked hay, keeping horses in boxes with access to the paddock or a window, with very good or good stable ventilation, with stable cleaning twice a day, as well as storage of hay and straw in the building outside the stable. Interestingly, weak positive correlations were noted between the amount of nasopharyngeal mucus and cleaning the stable less than once a day, as well as with storage of hay and straw in the stable in the attic. This finding may reflect the independence in the upper and lower respiratory airway in terms of mucus secretion due to environmental irritants. In this study, tracheal and nasopharyngeal mucus accumulation increased with EA severity, similar to the research of Couëttil et al. [17], and PLH grades, similar to the research of Holcombe et al. [19]; however, most do not correlate between these two locations. In this study, tracheal and nasopharyngeal mucus accumulation increased with EA severity, similar to the research of Couëttil et al. [17], and PLH grades as observed in the Holcombe et al. [19] study. However, there was mostly no correlation observed between these two locations. Only a positive but weak correlation was observed in SEA, which may suggest that SEA horses produce such an excess of mucus in the trachea that, during expectoration [17], it also accumulates in the nasopharyngeal area, affecting the local mucus amount. This smaller number and the strength of correlations between the amount of mucus in the studied locations, compared to what was assumed in the third hypothesis, may reflect a certain independence between upper and lower airway inflammation [11,28], especially since Koblinger et al. noted a similar lack of correlation [20]. However, even if the PLH grade does not correlate with tracheal mucus grade, some associations may still be investigated. It has been shown that irritation of the nasopharynx and larynx receptors may increase mucus secretion from the trachea by triggering reflexes that run through the glossopharyngeal nerves, the superior laryngeal nerves, and the pulmonary vagus nerves,

respectively [46,47]. While numerous studies on asthma are generally consistent, PLH has not received much attention. Therefore, further research is needed in a larger number of horses, in which sufficiently large groups with subsequent PLH grades will be EA-free and co-affected by MEA and SEA.

When considering the clinical usefulness of the presented results, the following limitations should be mentioned. The main limitation is the small sample size. Thus, a larger sample size should be enrolled to ensure that it is representative of the population, including healthy horses and both EA groups. Moreover, the study should be more adjusted considering the age of the horses, as the PLH has been shown to be age-related [48]. Finally, for a better understanding of the ongoing inflammatory process in equine airways, future research should pay more attention to the morphological and histological aspects. This approach would provide a more accurate and comprehensive understanding of the implications of the UAD concept in equine medicine.

## 5. Conclusions

EA is often accompanied by PLH, while PLH appeared more frequently in EA horses than EA-free horses as well as in SEA horses than in MEA horses. However, PLH did not play a role in increasing the severity of EA clinical symptoms. The role of the severity of accumulated mucus in the lower and upper airways when EA/PLH co-occur requires further research to confirm the morphological and functional unity of the respiratory tract, aligning with the concept of “united airways diseases”.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.K., M.W. and M.D.; methodology, N.K. and M.D.; software, M.D.; validation, T.J. and M.D.; formal analysis, T.J. and M.D.; investigation, N.K. and M.W.; resources, N.K.; data curation, N.K.; writing—original draft preparation, N.K. and M.D.; writing—review and editing, N.K., M.W., T.J. and M.D.; visualization, N.K. and M.D.; supervision, T.J. and M.D.; project administration, N.K.; funding acquisition, M.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** This research, using the results of veterinary clinical examinations, does not fall under the legislation for the protection of animals used for scientific purposes, national decree-law Dz. U. 2015 poz. 266 and 2010–63–EU directive. No ethical approval was needed.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Grossman, J. One Airway, One Disease. *Chest* **1997**, *111*, 11S–16S. [\[CrossRef\]](#)
2. Giovannini-Chami, L.; Paquet, A.; Sanfiorenzo, C.; Pons, N.; Cazareth, J.; Magnone, V.; Lebrigand, K.; Chevalier, B.; Vallauri, A.; Julia, V.; et al. The “One Airway, One Disease” Concept in Light of Th2 Inflammation. *Eur. Respir. J.* **2018**, *52*, 1800437. [\[CrossRef\]](#)
3. Chang, C.C. Sinusitis, rhinitis, asthma, and the single airway hypothesis. In *Diseases of the Sinuses: A Comprehensive Textbook of Diagnosis and Treatment*; Springer Science+Business Media: New York, NY, USA, 2014; pp. 173–194. [\[CrossRef\]](#)
4. Plaschke, P.P.; Janson, C.; Norrman, E.; Björnsson, E.; Ellbjär, S.; Järvholm, B. Onset and Remission of Allergic Rhinitis and Asthma and the Relationship with Atopic Sensitization and Smoking. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2000**, *162*, 920–924. [\[CrossRef\]](#)
5. Fokkens, W.; Lund, V.; Mullol, J. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps group European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2007. *Rhinol. Suppl.* **2007**, *20*, 1–136.
6. Joó, K.; Povázsai, Á.; Nyerges-Bohák, Z.; Szenci, O.; Kutasi, O. Asthmatic Disease as an Underlying Cause of Dorsal Displacement of the Soft Palate in Horses. *J. Equine Vet. Sci.* **2021**, *96*, 103308. [\[CrossRef\]](#)
7. Kozłowska, N.; Wierzbicka, M.; Jasiński, T.; Domino, M. Advances in the Diagnosis of Equine Respiratory Diseases: A Review of Novel Imaging and Functional Techniques. *Animals* **2022**, *12*, 381. [\[CrossRef\]](#)
8. Lo Feudo, C.M.; Stucchi, L.; Alberti, E.; Stancari, G.; Conturba, B.; Zucca, E.; Ferrucci, F. The Role of Thoracic Ultrasonography and Airway Endoscopy in the Diagnosis of Equine Asthma and Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage. *Vet. Sci.* **2021**, *8*, 276. [\[CrossRef\]](#)
9. King, D.S.; Tulleners, E.; Martin, B.B.; Parente, E.J.; Boston, R. Clinical Experiences with Axial Deviation of the Aryepiglottic Folds in 52 Racehorses. *Vet. Surg.* **2001**, *30*, 151–160. [\[CrossRef\]](#)



10. Couroucé, A.; Geffroy, O.; Barrey, E.; Auvinet, B.; Rose, R.J. Comparison of Exercise Tests in French Trotters under Training Track, Racetrack and Treadmill Conditions. *Equine Vet. J. Suppl.* **1999**, *31*, 528–532. [\[CrossRef\]](#)
11. Van Erck, E. Dynamic Respiratory Videoendoscopy in Ridden Sport Horses: Effect of Head Flexion, Riding and Airway Inflammation in 129 Cases. *Equine Vet. J.* **2011**, *43*, 18–24. [\[CrossRef\]](#)
12. Cook, W.R.; Williams, R.M.; Kirker-Head, C.A.; Verbridge, D.J. Upper Airway Obstruction (Partial Asphyxia) as the Possible Cause of Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage in the Horse: An Hypothesis. *J. Equine Vet. Sci.* **1988**, *8*, 11–26. [\[CrossRef\]](#)
13. McKane, S.A.; Slocombe, R.F. Experimental Mild Pulmonary Inflammation Promotes the Development of Exercise-Induced Pulmonary Haemorrhage. *Equine Vet. J. Suppl.* **2010**, *42*, 235–239. [\[CrossRef\]](#)
14. Couetil, L.; Cardwell, J.M.; Leguillette, R.; Mazan, M.; Richard, E.; Bienzle, D.; Bullone, M.; Gerber, V.; Ivester, K.; Lavoie, J.-P.; et al. Equine Asthma: Current Understanding and Future Directions. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 450. [\[CrossRef\]](#)
15. Ivester, K.M.; Cou  til, L.L.; Moore, G.E. An Observational Study of Environmental Exposures, Airway Cytology, and Performance in Racing Thoroughbreds. *J. Vet. Intern. Med.* **2018**, *32*, 1754–1762. [\[CrossRef\]](#)
16. Wasko, A.J.; Barkema, H.W.; Nicol, J.; Fernandez, N.; Logie, N.; Léguillette, R. Evaluation of a Risk-Screening Questionnaire to Detect Equine Lung Inflammation: Results of a Large Field Study. *Equine Vet. J.* **2011**, *43*, 145–152. [\[CrossRef\]](#)
17. Cou  til, L.L.; Cardwell, J.M.; Gerber, V.; Lavoie, J.-P.; Léguillette, R.; Richard, E.A. Inflammatory Airway Disease of Horses—Revised Consensus Statement. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 503–515. [\[CrossRef\]](#)
18. Bhaskar, B.; Fraser, J.F. Negative Pressure Pulmonary Edema Revisited: Pathophysiology and Review of Management. *Saudi J. Anaesth.* **2011**, *5*, 308–313. [\[CrossRef\]](#)
19. Holcombe, S.J.; Robinson, N.E.; Derksen, F.J.; Bertold, B.; Genovese, R.; Miller, R.; de Feiter Rupp, H.; Carr, E.A.; Eberhart, S.W.; Boruta, D.; et al. Effect of Tracheal Mucus and Tracheal Cytology on Racing Performance in Thoroughbred Racehorses. *Equine Vet. J.* **2006**, *38*, 300–304. [\[CrossRef\]](#)
20. Koblinger, K.; Nicol, J.; McDonald, K.; Wasko, A.; Logie, N.; Weiss, M.; Léguillette, R. Endoscopic Assessment of Airway Inflammation in Horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2011**, *25*, 1118–1126. [\[CrossRef\]](#)
21. Sullivan, E.K.; Parente, E.J. Disorders of the Pharynx. *Vet. Clin. Equine Pract.* **2003**, *19*, 159–167. [\[CrossRef\]](#)
22. Holcombe, S.; Ducharme, N. Disorders of the Nasopharynx and Soft Palate. In *Equine Respiratory Medicine and Surgery*; Saunders Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2007; pp. 437–457. ISBN 978-0-7020-2759-8.
23. Lo Feudo, C.M.; Stancari, G.; Collavo, F.; Stucchi, L.; Conturba, B.; Zucca, E.; Ferrucci, F. Upper and Lower Airways Evaluation and Its Relationship with Dynamic Upper Airway Obstruction in Racehorses. *Animals* **2022**, *12*, 1563. [\[CrossRef\]](#)
24. Tessier, C. The Equine Nasopharynx in Dynamic Upper Airway Disorders: An Update. *Pferdeheilkunde* **2006**, *22*, 565–568. [\[CrossRef\]](#)
25. Saulez, M.N.; Gummow, B. Prevalence of Pharyngeal, Laryngeal and Tracheal Disorders in Thoroughbred Racehorses, and Effect on Performance. *Vet. Rec.* **2009**, *165*, 431–435. [\[CrossRef\]](#)
26. Hobo, S.; Matsuda, Y.; Yoshida, K. Prevalence of Upper Respiratory Tract Disorders Detected with a Flexible Videoendoscope in Thoroughbred Racehorses. *J. Vet. Med. Sci.* **1995**, *57*, 409–413. [\[CrossRef\]](#)
27. Gerber, V.; Straub, R.; Marti, E.; Hauptman, J.; Herholz, C.; King, M.; Imhof, A.; Tahon, L.; Robinson, N.E. Endoscopic Scoring of Mucus Quantity and Quality: Observer and Horse Variance and Relationship to Inflammation, Mucus Viscoelasticity and Volume. *Equine Vet. J.* **2004**, *36*, 576–582. [\[CrossRef\]](#)
28. Holcombe, S.J.; Jackson, C.; Gerber, V.; Jefcoat, A.; Berney, C.; Eberhardt, S.; Robinson, N.E. Stabling Is Associated with Airway Inflammation in Young Arabian Horses. *Equine Vet. J.* **2001**, *33*, 244–249. [\[CrossRef\]](#)
29. Léguillette, R.; Lavoie, J.-P. Effects of the Bronchoalveolar Lavage Procedure on Lung Function in Horses with Clinical Exacerbation of Recurrent Airway Obstruction. *Am. J. Vet. Res.* **2006**, *67*, 1929–1933. [\[CrossRef\]](#)
30. Tilley, P.; Sales Luis, J.P.; Branco Ferreira, M. Correlation and Discriminant Analysis between Clinical, Endoscopic, Thoracic X-Ray and Bronchoalveolar Lavage Fluid Cytology Scores, for Staging Horses with Recurrent Airway Obstruction (RAO). *Res. Vet. Sci.* **2012**, *93*, 1006–1014. [\[CrossRef\]](#)
31. Wysocka, B.; Kluci  ski, W. Usefulness of the Assessment of Discharge Accumulation in the Lower Airways and Tracheal Septum Thickening in the Differential Diagnosis of Recurrent Airway Obstruction (RAO) and Inflammatory Airway Disease (IAD) in the Horse. *Pol. J. Vet. Sci.* **2014**, *17*, 247–253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Gerber, V.; Lindberg,   .; Berney, C.; Robinson, N.E. Airway Mucus in Recurrent Airway Obstruction—Short-Term Response to Environmental Challenge. *J. Vet. Intern. Med.* **2004**, *18*, 92–97. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Sliwinski, H.; Krabisch, P.; Rosenberger, E.; Schwarz, F.J. Hygienic Quality of Different Forages and Concentrates for Horses. *Pferdeheilkunde Equine Med.* **2005**, *21*, 26. [\[CrossRef\]](#)
34. Intemann, S.; Reckels, B.; Schubert, D.C.; Wolf, P.; Kamphues, J.; Visscher, C. The Microbiological Quality of Concentrates for Horses—A Retrospective Study on Influencing Factors and Associations with Clinical Symptoms Reported by Owners or Referring Vets. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 413. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Vandenput, S.; Istasse, L.; Nicks, B.; Lekeux, P. Airborne Dust and Aeroallergen Concentrations in Different Sources of Feed and Bedding for Horses. *Vet. Q.* **1997**, *19*, 154–158. [\[CrossRef\]](#)
36. Bagshaw, J.; Sanz, M.; Wang, Y.; Shoemaker, S.; Bayly, W. Severity and Effects of Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia Vary with Age and Racetrack Location in Thoroughbred Racehorses. *Comp. Exerc. Physiol.* **2023**, *1*, 1–12. [\[CrossRef\]](#)

37. Clarke, A.F.; Madelin, T.M.; Allpress, R.G. The Relationship of Air Hygiene in Stables to Lower Airway Disease and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Two Groups of Thoroughbred Horses. *Equine Vet. J.* **1987**, *19*, 524–530. [[CrossRef](#)]
38. Van Cleemput, J.; Poelaert, K.C.K.; Laval, K.; Impens, F.; Van den Broeck, W.; Gevaert, K.; Nauwynck, H.J. Pollens Destroy Respiratory Epithelial Cell Anchors and Drive Alphaherpesvirus Infection. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 4787. [[CrossRef](#)]
39. Cook, W.R. Some Observations on Diseases of the Ear, Nose and Throat in the Horse, and Endoscopy Using a Flexible Fibreoptic Endoscope. *Vet. Rec.* **1974**, *94*, 533–541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Blakeslee, J.R., Jr.; Olsen, R.G.; McAllister, E.S.; Fassbender, J.; Dennis, R. Evidence of Respiratory Tract Infection Induced by Equine Herpesvirus, Type 2, in the Horse. *Can. J. Microbiol.* **1975**, *21*, 1940–1946. [[CrossRef](#)]
41. Holcombe, S.J.; Derksen, F.J.; Berney, C.; Becker, A.C.; Horner, N.T. Effect of Topical Anesthesia of the Laryngeal Mucosa on Upper Airway Mechanics in Exercising Horses. *Am. J. Vet. Res.* **2001**, *62*, 1706–1710. [[CrossRef](#)]
42. Raker, C.W. Diseases of the Pharynx. *Mod. Vet. Pract.* **1976**, *57*, 396–400.
43. Simões, J.; Tilley, P. Decision Making in Severe Equine Asthma—Diagnosis and Monitoring. *Animals* **2023**, *13*, 3872. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hansen, S.; Honoré, M.L.; Riihimäki, M.; Pringle, J.; Ammentorp, A.H.; Fjeldborg, J. Seasonal Variation in Tracheal Mucous and Bronchoalveolar Lavage Cytology for Adult Clinically Healthy Stabled Horses. *J. Equine Vet. Sci.* **2018**, *71*, 1–5. [[CrossRef](#)]
45. Gerber, V.; Robinson, N.E.; Luethi, S.; Marti, E.; Wampfler, B.; Straub, R. Airway Inflammation and Mucus in Two Age Groups of Asymptomatic Well-performing Sport Horses. *Equine Vet. J.* **2003**, *35*, 491–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Phipps, R.J.; Richardson, P.S. The Effects of Irritation at Various Levels of the Airway upon Tracheal Mucus Secretion in the Cat. *J. Physiol.* **1976**, *261*, 563–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Rothe, T.; Karrer, W. Functional Upper Airway Obstruction and Chronic Irritation of the Larynx. *Eur. Respir. J.* **1998**, *11*, 498–500. [[CrossRef](#)]
48. Auer, D.E.; Wilson, R.G.; Groenendyk, S. Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Thoroughbred Racehorses in Training. *Aust. Vet. J.* **1985**, *62*, 124–126. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

### **Oświadczenia współautorów publikacji [P.3]**



Warszawa, 02.09.2025 r.

lek. wet. Natalia Kozłowska  
natalia\_kozłowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkół Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2024) Co-Occurrence of Equine Asthma and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Pleasure Horses. Agriculture, 14(7), 1157* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metody badawczej, zapewnieniu zasobów do realizacji badań, udziale w przeprowadzeniu badań, przechowywaniu danych, udziale w przygotowaniu wizualizacji, zarządzaniu projektem, udziale w przygotowaniu szkicu manuskryptu oraz udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu.



(Podpis)

Warszawa, 02.09.2025 r,

Dr Małgorzata Wierzbicka  
malgorzata\_wierzbicka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

**Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2024) Co-Occurrence of Equine Asthma and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Pleasure Horses. Agriculture, 14(7), 1157* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w przeprowadzeniu badań oraz udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu.

  
.....  
(Podpis)

Warszawa, 02.09.2025 r.

Dr Tomasz Jasiński  
tomasz\_jasinski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoly Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2024) Co-Occurrence of Equine Asthma and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Pleasure Horses. Agriculture, 14(7), 1157* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w analizie danych, udziale w walidacji uzyskanych wyników, udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu oraz udziale w nadzorze nad pracą zespołu.

.....  
(Podpis)

Warszawa, 02.09.2025 r.

Dr hab. Małgorzata Domino, prof. uczelni  
malgorzata\_domino@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Wierzbicka, M., Jasiński, T., & Domino, M. (2024) Co-Occurrence of Equine Asthma and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Pleasure Horses. Agriculture, 14(7), 1157* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metody badawczej, zapewnieniu oprogramowania do realizacji badań, udziale w analizie danych, udziale w walidacji uzyskanych wyników, udziale w przygotowaniu wizualizacji, udziale w przygotowaniu szkicu manuskryptu, udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu, udziale w nadzorze nad pracą zespołu oraz pozyskaniu finansowania badań.

  
.....  
(Podpis)



## Article

# Computer-Aided Diagnosis of Equine Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia Using the Object Detection-Based Processing Technique of Digital Endoscopic Images

Natalia Kozłowska <sup>1</sup> , Marta Borowska <sup>2,\*</sup> , Tomasz Jasiński <sup>1</sup> , Małgorzata Wierzbicka <sup>1</sup> and Małgorzata Domino <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Large Animal Diseases and Clinic, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland; natalia\_kozlowska@sggw.edu.pl (N.K.); tomasz\_jasinski@sggw.edu.pl (T.J.); malgorzata\_wierzbicka@sggw.edu.pl (M.W.)

<sup>2</sup> Institute of Biomedical Engineering, Faculty of Mechanical Engineering, Białystok University of Technology, 15-351 Białystok, Poland

\* Correspondence: m.borowska@pb.edu.pl (M.B.); malgorzata\_domino@sggw.edu.pl (M.D.); Tel.: +48-22-59-36-191 (M.D.)

## Simple Summary

Artificial intelligence is increasingly being applied in medical practice, particularly in computer-aided diagnosis (CAD). While these applications are already common in humans, they have only recently been introduced in veterinary medicine, especially in equine practice. This study aimed to evaluate the effectiveness of CAD in diagnosing one of the respiratory tract diseases—pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH). Since PLH is visually diagnosed based on the size and number of lymphoid follicles within the pharyngeal mucosa, this study employed an object detection-based processing technique to identify lymphoid follicles on endoscopic images and combined it with two digitization approaches—Voronoi diagrams and first-order statistics (FOS)—to quantify endoscopic signs of PLH. A digital data set thus obtained from 70 horses was combined with a clinical data set, representing respiratory tract clinical symptoms, to assess classification performance using the machine learning algorithm. The proposed CAD method achieved the highest classification metrics—0.76 accuracy and 0.83 precision—when both data sets were combined. This performance was higher compared to applying the CAD method to either data set alone. The proposed CAD method provides effective discrimination of PLH grades and may be further applied to the assessment of equine pharyngeal endoscopic images.

## Abstract

In human medicine, computer-aided diagnosis (CAD) is increasingly employed for screening, identifying, and monitoring early endoscopic signs of various diseases. However, its potential—despite proven benefits in human healthcare—remains largely underexplored in equine veterinary medicine. This study aimed to quantify endoscopic signs of pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) as digital data and to assess their effectiveness in CAD of PLH in comparison and in combination with clinical data reflecting respiratory tract disease. Endoscopic images of the pharynx were collected from 70 horses clinically assessed as either healthy or affected by PLH. Digital data were extracted using an object detection-based processing technique and first-order statistics (FOS). The data were transformed using linear discriminant analysis (LDA) and classified with the random forest (RF) algorithm. Classification metrics were then calculated. When considering digital and clinical data, high classification performance was achieved (0.76 accuracy, 0.83 precision, 0.78 recall, and 0.76 F1 score), with the highest importance assigned to selected FOS features: Number of



Academic Editors: Clara Mancini and Jake Veasey

Received: 19 August 2025

Revised: 18 September 2025

Accepted: 19 September 2025

Published: 22 September 2025

**Citation:** Kozłowska, N.; Borowska, M.; Jasiński, T.; Wierzbicka, M.; Domino, M. Computer-Aided Diagnosis of Equine Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia Using the Object Detection-Based Processing Technique of Digital Endoscopic Images. *Animals* **2025**, *15*, 2758. <https://doi.org/10.3390/ani15182758>

**Copyright:** © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Objects and Neighbors, and Tracheal Auscultation. The proposed protocol of digitizing standard respiratory tract diagnostic methods provides effective discrimination of PLH grades, supporting the clinical value of CAD in veterinary medicine and paving the way for further research in digital medical diagnostics.

**Keywords:** pharyngitis; lymphoid follicles; Voronoi diagram; image texture; horse

## 1. Introduction

In recent years, artificial intelligence-based medical applications, such as computer-aided diagnosis (CAD) methods, have begun to support standard diagnostic practice by assisting clinicians and radiologists in analyzing medical images [1]. In human healthcare, CAD methods have been proposed for the automatic classification of, e.g., endoscopic images [1–3], ultrasound images [4], radiographic images [5], computed topographic (CT) images [6], magnetic resonance (MR) images [7], and positron emission tomography (PET) images in combination with CT [8] or MR [9]. CAD methods have been applied to screening, identifying, and monitoring early signs of diseases, providing important diagnostic benefits—such as reducing the risk of misdiagnosis, increasing diagnostic accuracy, and accelerating the diagnostic process—ultimately enabling earlier implementation of appropriate treatment [1,2]. In particular, many CAD methods have been developed for endoscopic imaging of the gastrointestinal tract, supporting the early diagnosis of polyps, ulcers, and perforations, thereby reducing both the incidence and mortality of gastrointestinal cancers [3,10–13]. In veterinary diagnostic imaging, especially in equine clinical practice and research, only a limited number of studies have addressed CAD applications. These include studies on the classification of radiographic images [14,15] and CT images [16], as well as the use of artificial intelligence to automate routine tasks such as CT image segmentation [17] and morphometric measurements [18,19]. However, to date, no research studies or case reports have investigated the application of CAD to endoscopic images in equine veterinary medicine, leaving this field largely underexplored. In this study, a procedure developed for human diagnostics was adapted for equine diagnostics to provide animals access to CAD and its benefits, as animals—like humans—also require a reduced risk of misdiagnosis, improved diagnostic accuracy, and a faster diagnostic process.

In equine veterinary medicine, pharyngitis—referred to as pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH)—is an upper respiratory tract disease diagnosed and graded visually by resting endoscopy [20,21]. The presence and severity of PLH are assessed on a 0–4 scale based on the endoscopic appearance of the pharyngeal mucosa [20,21]. Grade 0 represents a normal pharynx, whereas grades 1–4 indicate pharyngitis. Grades 1 and 2 are characterized by small lymphoid follicles located on the dorsal wall or dorsal and lateral walls of the pharynx, respectively. Grades 3 and 4 are characterized by large and edematous lymphoid follicles, respectively, regardless of location [20,21]. Since the number and size of lymphoid follicles increase with PLH severity, these follicles can be treated as objects, whose detection via object detection-based processing technique forms the basis for digitizing endoscopic signs. For PLH digitization, we propose quantifying both the proximity and area of detected objects/lymphoid follicles using Voronoi diagrams, as well as their texture using first-order statistics (FOS). Both approaches have been previously applied in equine research for digitizing thermographic images [22], radiographic images [23], and microscopic images [24].

Lymphoid follicles are composed of densely aggregated nodular lymphoid tissue within the pharyngeal mucosa and form part of the local immune system [25]. They repre-

sent the first line of immune defense against viral and bacterial infections [21,26], as well as against stabling-related irritant particles and allergens [27], playing a critical role in protecting the respiratory tract from infection and irritation-based inflammation [28,29]. When the local immune response to inhaled antigens and irritants becomes heightened, pharyngitis develops, and endoscopic signs of PLH become apparent [30]. In young horses (under 5 years old), PLH is considered a normal stage of upper airway immunological development, reflecting their initial exposure to environmental airborne stimuli [21,31]. In contrast, in older horses (over 5 years old), PLH occurs less frequently [32] and is associated with a more clinically significant active inflammatory process [21,33]. In such cases, PLH frequently co-occurs with other respiratory tract diseases, such as nasopharyngeal collapse [34], dorsal displacement of the soft palate [34–36], aryepiglottic fold collapse [34], guttural pouch infection [33], equine asthma [37], or influenza [38].

One may observe that early and accurate diagnosis of PLH addresses the needs of equine veterinarians, horse breeders, trainers, competitors, and, above all, horses. The proposed CAD protocol enables objective screening, identification, and monitoring of physiological data that are considered early signs of PLH, thereby improving our understanding of the clinical state of animals and allowing management, training, and treatment to be tailored to the needs of horses to maintain their welfare. For example, PLH in horses over 5 years old has been proposed as a predisposing factor for diseases of the upper airway—such as nasopharyngeal collapse [34], dorsal displacement of the soft palate [34–36], and aryepiglottic fold collapse [34]—as well as the lower airway, such as equine asthma [37], all of which significantly impair performance. This phenomenon arises because inflammation of the upper and lower airways typically shares the same underlying characteristics, as described in the concept of “unified airways”, also referred to as “One Airway, One Disease” [39,40]. The anatomical continuity and histological similarity of airway segments, which underlie the functional integration of the upper and lower airways [40,41], make older horses with PLH more susceptible to co-occurring respiratory diseases. In these horses, faster and more accurate PLH diagnosis—encouraging equine veterinarians, horse breeders, trainers, and competitors to reduce training, limit exertion, and pursue more targeted diagnostics of the respiratory tract—will help avoid work by subclinical horses and accelerate recovery.

By contrast, in horses under 5 years old, PLH is not considered a risk factor for poor performance [36,42–44], as it reflects the normal immunological development of the upper airway during this period [21,31]. In these horses, maintaining training despite PLH symptoms does not compromise welfare, as most young racehorses studied had no history of poor performance, even though approximately one-third of them presented grades 3–4 PLH [36,42,43]. However, even in young horses with PLH, further CAD and clinical monitoring may be beneficial by enabling earlier detection of potential health and welfare deterioration, as the following studies have indicated some relationships between physiological data and the needs and performance of young horses. One study reported that higher PLH grades were associated with a decreased likelihood of completing race [44]. Another study found that severe PLH was linked with impaired performance, evidenced by fewer starts, fewer wins, lower placing, and reduced earnings [45]. Another study demonstrated that 2- and 3-year-old horses with higher PLH grades showed reduced speed index, while 4-year-old and older horses with higher PLH grades exhibited impaired performance [46]. Given that all these large cohort studies focused on young thoroughbred racehorses [36,42–46], PLH in older horses appears to be underinvestigated.

This study aimed to quantify endoscopic signs of PLH as digital data and to evaluate their effectiveness in CAD of PLH, both in comparison with and in combination with clinical data reflecting respiratory tract diseases. Given that the clinical significance of PLH

in young horses is debatable [36,42–46], this study was designed to enroll only horses older than 5 years old.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Design

This retrospective analytical study reviewed the clinical records of 219 warmblood horses that underwent resting endoscopy between January 2022 and January 2025 at the Equine Clinic of the Warsaw University of Life Sciences. The horses were privately owned patients, examined at their owners' request due to abnormal respiratory noise, nasal discharge, coughing, or poor performance, or for pre-purchase evaluation.

The inclusion criteria were as follows: age over 5 years, a complete clinical record including clinical symptoms scores and endoscopic signs scores for PLH grading, endoscopy performed using the same flexible video bronchoscope, and availability of a high-quality endoscopic image of the pharynx. The exclusion criteria were as follows: age 5 years or younger, missing clinical symptoms scores, missing endoscopic signs scores for PLH grading, use of a different endoscope, absence of a saved endoscopic image of the pharynx, or poor image quality. Seventy clinical records ( $n = 70$ ) met the inclusion criteria and were included in the study, while one hundred forty-eight clinical records ( $n = 149$ ) were excluded, predominately due to too young age.

### 2.2. Clinical Data Collection

A detailed respiratory tract examination was performed according to the standard protocol [47]. This included scoring the following clinical symptoms of respiratory tract diseases: Respiratory Rate measurement (0–3 scores), evaluation of Nasal Discharge (0–2 scores), Tracheal Auscultation (0–3 scores), Thoracic Auscultation (0–3 scores), evaluation of Nasal Flare (0–1 scores), Cough Scoring (0–2 scores), and Abdominal Lift assessment (0–2 scores), using descriptors summarized in our previously published clinical symptoms scoring system [47] and outlined in Table 1. To ensure standardization of the clinical results, all horses were examined and then scored by the same two veterinarians (N.K. and M.W.). Any disagreements were resolved by a third party (M.D.).

Resting endoscopy was performed in accordance with international guidelines [48] using a flexible video bronchoscope (8 × 2000 mm; Karl Storz, Tuttlingen, Germany). The horses were sedated with detomidine hydrochloride (Domosedan; Orion Corporation, Espoo, Finland; 0.01 mg/kg body weight, i.v.) and butorphanol (Torbugesic; Zoetis Polska Sp. z o.o., Warsaw, Poland; 0.01 mg/kg body weight, i.v.), with doses calculated individually based on each horse's body weight. During resting endoscopy, the nasopharynx, larynx, trachea, and tracheal septum were evaluated; however, only the pharyngeal region was analyzed in this study. When the endoscope was positioned in the pharynx anterior to the larynx, the digital images were frozen and saved as BMP files. At least five images of the pharynx were captured for each horse, while only one high-quality image—free of motion blur and clearly showing the pharyngeal vault, larynx, and the fully abducted epiglottis—was selected for further analysis. Additionally, the presence and amount of mucus on the dorsal and lateral walls of the pharynx were scored using our previously published scoring system (0–3 scores) [37].

Clinical data were then compiled as a series of 7 clinical symptoms and 1 Mucus Score for each horse and used for further analysis.

**Table 1.** Clinical symptoms of respiratory tract diseases used for detailed respiratory tract examination scoring.

| Clinical Symptoms     | Descriptor                                                          | Score |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------|-------|
| Respiratory Rate      | <16                                                                 | 0     |
|                       | 17–20                                                               | 1     |
|                       | 21–30                                                               | 2     |
|                       | >30                                                                 | 3     |
| Nasal Discharge       | none                                                                | 0     |
|                       | serous                                                              | 1     |
|                       | mucopurulent/epistaxis                                              | 2     |
| Tracheal Auscultation | normal tracheal sounds                                              | 0     |
|                       | slight increase                                                     | 1     |
|                       | clearly audible increased                                           | 2     |
|                       | crackles and wheezing present                                       | 3     |
| Thorax Auscultation   | normal pulmonary sounds                                             | 0     |
|                       | slight increased pulmonary sounds                                   | 1     |
|                       | clearly audible increased pulmonary sounds                          | 2     |
|                       | crackles and wheezing present                                       | 3     |
| Nostril Flare         | none                                                                | 0     |
|                       | present                                                             | 1     |
| Cough Score           | none                                                                | 0     |
|                       | coughs at specific times of day<br>(feeding/exercising/making beds) | 1     |
|                       | frequent cough                                                      | 2     |
| Abdominal Lift        | none                                                                | 0     |
|                       | slight flattening of ventral flank                                  | 1     |
|                       | obvious abdominal lift and “heave line”                             | 2     |

#### Clinical Grading of PLH

During resting endoscopy, the presence and grade of PLH [20,21] were assessed using an endoscopic signs scoring system for PLH grading [37], based on the descriptors outlined in Table 2. In this system, the pharyngeal mucosa was visually evaluated. The absence of visible lymphoid tissue was scored as 0, corresponding to grade 0 PLH. In contrast, the presence of lymphoid follicles was gradually scored from 1 to 4, where the presence of a few small lymphoid follicles was scored as 1, corresponding to grade 1 PLH, and the presence of numerous large, edematous lymphoid follicles was scored as 4, corresponding to grade 4 PLH. To ensure standardization of the endoscopic results, all horses were endoscopically examined and then scored by the same two veterinarians (N.K. and M.W.). Any disagreements were resolved by a third party (M.D.).

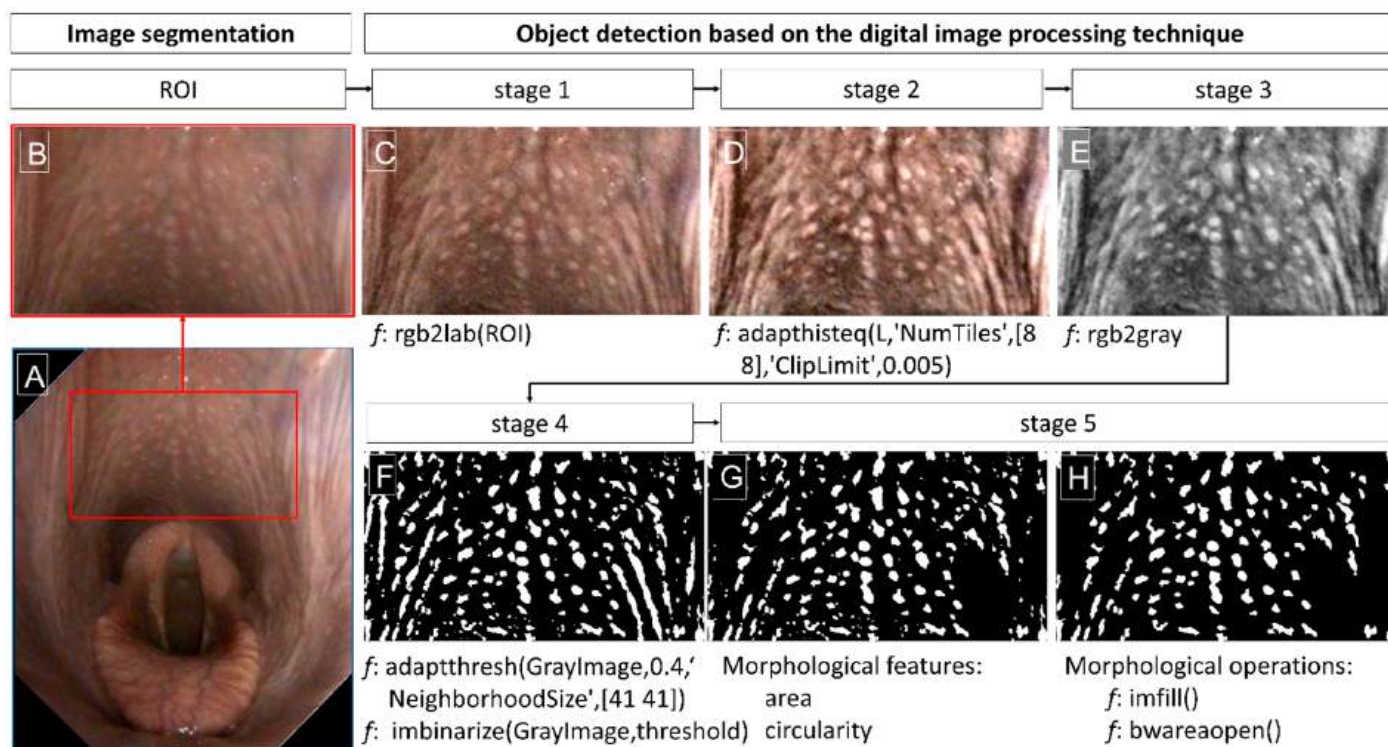
**Table 2.** Endoscopic signs of the pharyngeal mucosa used for pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) grading.

| PLH Grade | Endoscopic Signs of the Pharyngeal Mucosa                                                                                                           |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Grade 0   | No visible lymphoid tissue                                                                                                                          |
| Grade 1   | A few small white lymphoid follicles on the dorsal wall of the pharynx                                                                              |
| Grade 2   | Numerous small lymphoid follicles on the dorsal and lateral walls of the pharynx                                                                    |
| Grade 3   | Numerous large hyperemic lymphoid follicles on the entire dorsal and lateral walls of the pharynx                                                   |
| Grade 4   | Numerous large edematous hyperemic lymphoid follicles coalesce broad-based polypoid aggregate on the entire dorsal and lateral walls of the pharynx |



### 2.3. Digital Data Collection

Each endoscopic image of the pharynx was initially rotated and scaled to a uniform larynx position and size, using a template consisting of a 46 mm × 58 mm oval positioned tangentially beneath a 50 mm × 90 mm rectangle. A raw image was scaled so that the oval aligned with the epiglottis in the vertical position, and the rectangle outlined the pharyngeal vault, ensuring a standardized surface area (Figure 1A). An image was then cropped to the dimensions of the rectangle, and a region of interest (ROI) measuring 297 pixels in height and 533 pixels in width was annotated and saved as a BMP file (Figure 1B).



**Figure 1.** Endoscopic image processing workflow: a raw image after rotation and scaling (A), region of interest (ROI) after cropping from a raw image (B), image after preprocessing (stage 1) (C), image after contrast enhancement (stage 2) (D), image after conversion to grayscale (stage 3) (E), image after initial object detection (stage 4) (F), and image after refine object detection (stage 5) composed by removing too long objects based on the morphological features (G) and removing too small objects based on the morphological operations (H).

ROIs were imported into MATLAB software version R2024b (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA), and the object detection-based digital image processing technique was implemented in the following five key stages (1–5).

In stage 1—image preprocessing—each ROI was converted from the RGB color space to the CIE Lab color space. The conversion allows for independent manipulation of the lightness channel (L) without affecting the chromatic components. The component L was obtained from the MATLAB function `rgb2lab(ROI)`, originally defined by Hunter [49] (Figure 1C).

In stage 2—contrast enhancement—adaptive histogram equalization, such as Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization (CLAHE) algorithm, was applied to the lightness component to enhance local contrast in smaller regions of the image, while controlling noise amplification through contrast clipping. This operation was done using the MATLAB function `adapthisteq(L,'NumTiles',[8 8],'ClipLimit',0.005)` [50] (Figure 1D).

In stage 3—conversion to grayscale—ROIs were converted to grayscale using MATLAB function `rgb2gray` (Figure 1E).

In stage 4—initial object detection—adaptive thresholding was calculated using the MATLAB function `adaptthresh(GrayImage,0.4,'NeighborhoodSize',[41 41])` and binarization was performed using the MATLAB function `imbinarize(GrayImage, threshold)`. Adaptive thresholding was used to segment objects from the background based on local intensity variations, while binarization was used to convert the data into a binary format (Figure 1F).

In stage 5—refine object detection—morphological features and morphological operations were used to improve the detection of relevant objects. Morphological features, such as area and circularity, were applied to all detected objects. The morphological features were used to remove objects that were too long, such as folds located on the lateral wall of the pharynx and covering guttural pouch ostia (Figure 1G). Morphological operations, such as the MATLAB functions `imfill()` and `bwareaopen()`, were also applied to all detected objects. Function `imfill()` fills all holes in objects, and function `bwareaopen` deletes objects that are too small (Figure 1H).

Based on the described digital image processing technique, the objects representing the lymphoid follicles in the pharyngeal mucosa were detected, the Number of Objects was counted, and a Voronoi diagram was determined for each ROI represented by a set of objects  $P$  in a plane. The plane was divided into regions of influence—referred to as Voronoi regions—associated with points from the set  $P$ , such that each point in the associated region was closer to the associated object than to the other objects from the set  $P$  [51]. The shapes of the Voronoi regions depend on the distance metric, e.g., Euclidean distance, and the collection of all the Voronoi forms the Voronoi diagram. Voronoi diagrams were used to determine computational geometry by extracting the following Voronoi diagram features: Area, Area Over Voronoi, Number of Neighbors, Mean Neighbor Distance, Regularity, and Entropy [52–54].

Then, the texture features were extracted for each detected object using the MATLAB function `regionprops()` in MATLAB software version R2024b (MathWorks, Natick, MA, USA). The following features were extracted using formulas for FOS published in our previous study [22]: Mean, Standard Deviation, Median, Range, Variance, Skewness, Kurtosis, Root Mean Squared, Minimum, Maximum, 10th Percentile, 90th Percentile, Dominant 01, Dominant 10, Maximum of Moment 01, and Maximum of Moment 10.

For each detected object, 6 Voronoi diagram features and 16 FOS features were extracted. Given that the Number of Objects differed between PLH grades, the mean feature values were calculated for each image and used for further analysis.

#### 2.4. Statistical Analysis

Clinical data (7 clinical symptoms, 1 Mucus Score) and digital data (6 Voronoi diagram features; 16 FOS features) were grouped for PLH grades and tested for Gaussian distributions using the Kolmogorov–Smirnov normality test. Each symptom/feature data series was compared between PLH grades using the ANOVA summary, when all data series were Gaussian distributed; or the Kruskal–Wallis test, when at least one data series was non-Gaussian distributed. The alpha value was established as  $\alpha = 0.05$ . When significant differences were found in the first test, a post hoc test was performed. The ANOVA summary was followed by Holm–Sidak’s multiple comparisons test, while the Kruskal–Wallis test was followed by Dunn’s multiple comparisons test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

### 2.5. Endoscopic Image Classification

All data series were arranged into three data sets representing clinical data only, digital data only, and a combination of clinical and digital data (clinical+digital data). The same classification scheme and measurement of its effectiveness were used for each data set.

First, linear discriminant analysis (LDA) was used to reduce dimensionality [55]. The LDA approach simplifies classification [56] by transforming features from a high-dimensional space to a lower-dimensional space [57,58]. LDA was implemented using the scikit-learn library in Python software version 3.11 [59].

Then, the Random Forest (RF) algorithm was used to distinguish between five classes representing PLH grades 0–4. Features with the highest feature importance were used to train and evaluate a classification model [60,61]. Classification performance was evaluated using 5-fold stratified cross-validation accuracy. RF was implemented using the scikit-learn library in Python [59,62]. The classifier's effectiveness was evaluated based on the following classification metrics: Accuracy, Precision, Recall, and F1.

## 3. Results

### 3.1. Clinical Data-Based Characteristics of PLH

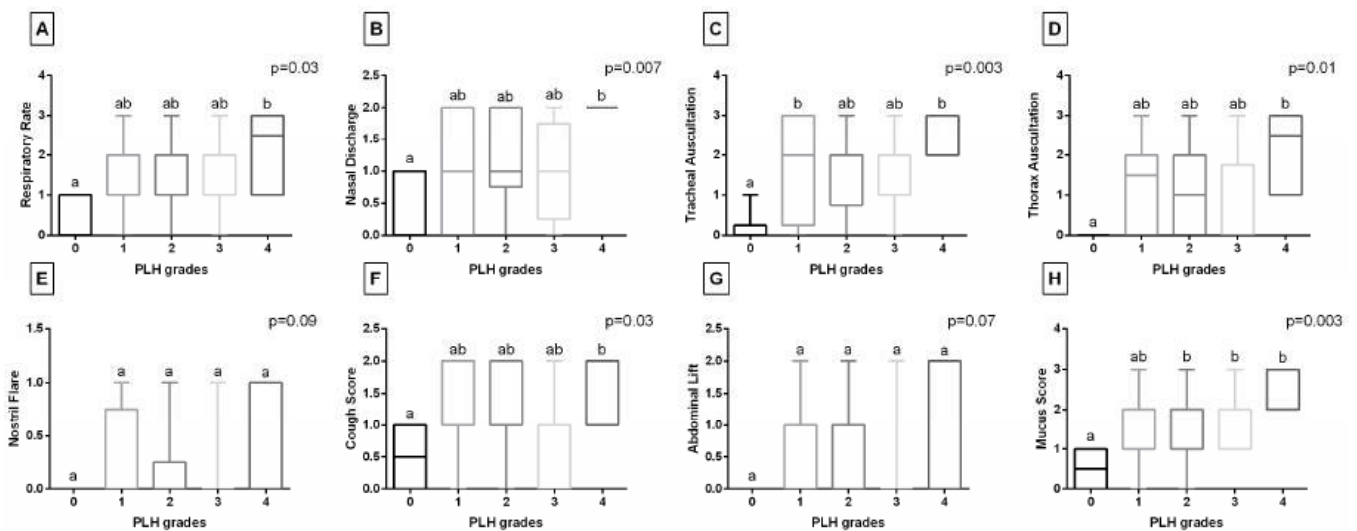
Endoscopic signs of PLH grade 1 were observed in 16 horses (5 mares, 9 geldings, 2 stallions) with a median age of 16 years. PLH grade 2 was observed in 26 horses (12 mares, 14 geldings) with a median age of 12 years. PLH grade 3 was observed in 16 horses (6 mares, 10 geldings) with a median age of 10 years. PLH grade 4 was observed in 6 horses (5 mares, 1 geldings) with a median age of 9 years. No endoscopic signs of PLH (grade 0) were observed in 6 horses (1 mare, 2 geldings, 3 stallions) with a median age of 6 years. Horses with PLH grades 2–4 were younger than those with grade 0. Detailed demographic data are presented in Table 3.

**Table 3.** Demographic data (sex, age) of horses with pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) grades (0–4). For sex, the number of mares, geldings, and stallions among the PLH groups is provided. The median and range (minimum and maximum values) are provided and compared for age. Superscript letters indicate differences in horses' age between PLH grades for  $p < 0.05$ .

| Demographic Data | PLH Grades            |                        |                       |                       |                      |
|------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
|                  | Grade 0               | Grade 1                | Grade 2               | Grade 3               | Grade 4              |
| <b>Sex</b>       |                       |                        |                       |                       |                      |
| Mare             | 1                     | 5                      | 12                    | 6                     | 5                    |
| Gelding          | 2                     | 9                      | 14                    | 10                    | 1                    |
| Stallion         | 3                     | 2                      | 0                     | 0                     | 0                    |
| In total         | 6                     | 16                     | 26                    | 16                    | 6                    |
| <b>Age</b>       |                       |                        |                       |                       |                      |
| Median           | 16 <sup>a</sup> years | 12 <sup>ab</sup> years | 12 <sup>b</sup> years | 10 <sup>b</sup> years | 9 <sup>b</sup> years |
| Range (Min; Max) | (13; 19)              | (6; 24)                | (6; 18)               | (6; 16)               | (6; 14)              |
| $p$ value        | $p = 0.009$           |                        |                       |                       |                      |

Considering the clinical symptoms of respiratory tract diseases (Figure 2A–G), Respiratory Rate, Nasal Discharge, Thorax Auscultation, and Cough Score were higher in horses with PLH grade 4 compared to those with grade 0. Additionally, Tracheal Auscultation was higher in horses with PLH grades 1 and 4 than in those with grade 0. No differences were found between PLH grades for Nostril Flare and Abdominal Lift. When the clinical data set was complemented with endoscopic signs, Mucus Score was found to be higher in horses with PLH grades 2–4 compared to those with grade 0 (Figure 2H).

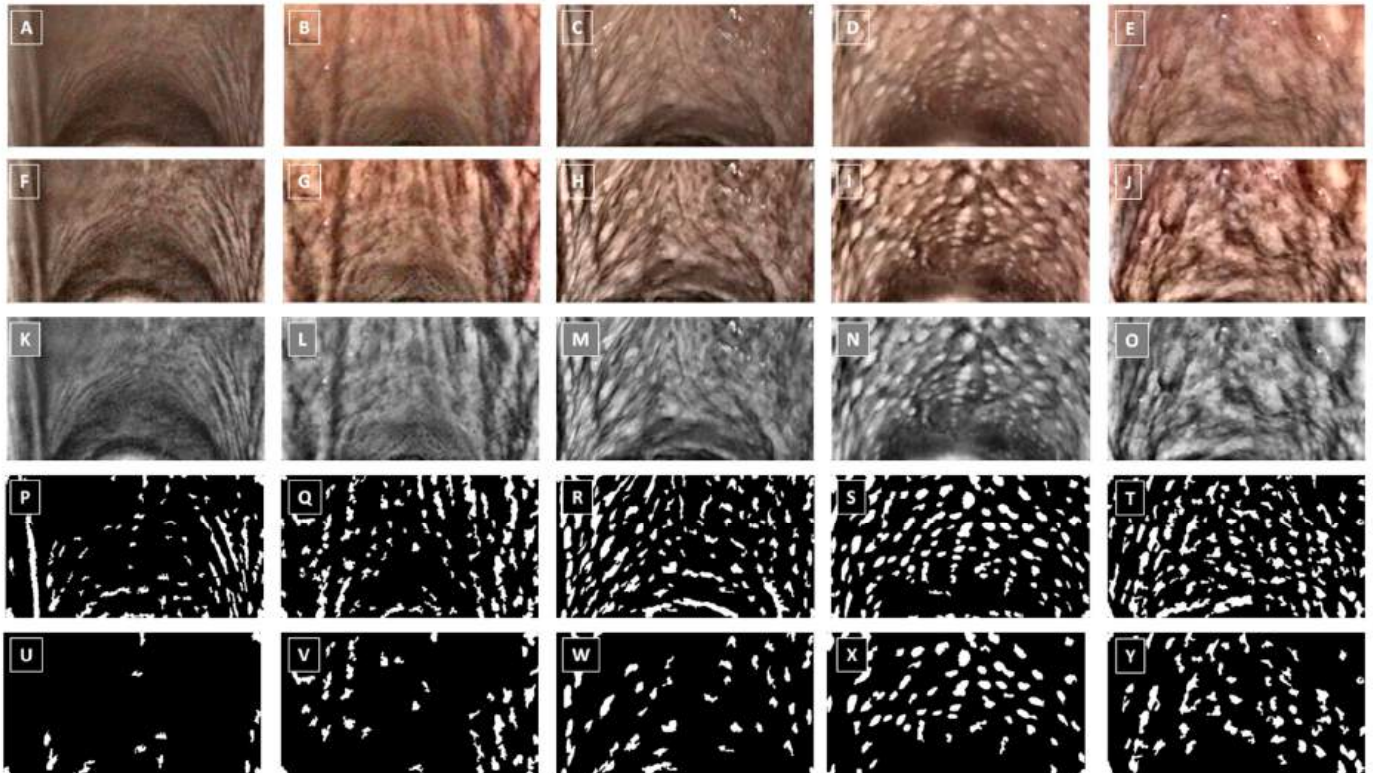




**Figure 2.** Comparison of clinical data - Respiratory Rate (A), Nasal Discharge (B), Tracheal Auscultation (C), Thorax Auscultation (D), Nostril Flare (E), Cough Score (F), Abdominal lift (G), and Mucus Score (H)—collected from horses with pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) grades (0–4). Boxes represent median and lower and upper quartiles, while whiskers represent minimum and maximum values. Superscript letters indicate differences between PLH grades for  $p < 0.05$ .

### 3.2. Digital Data-Based Characteristics of PLH

The Number of Objects detected using the applied object detection-based processing technique was higher in horses with PLH grades 3–4 compared to those with grades 0–2 (Table 4), and their representations are shown in Figure 3.

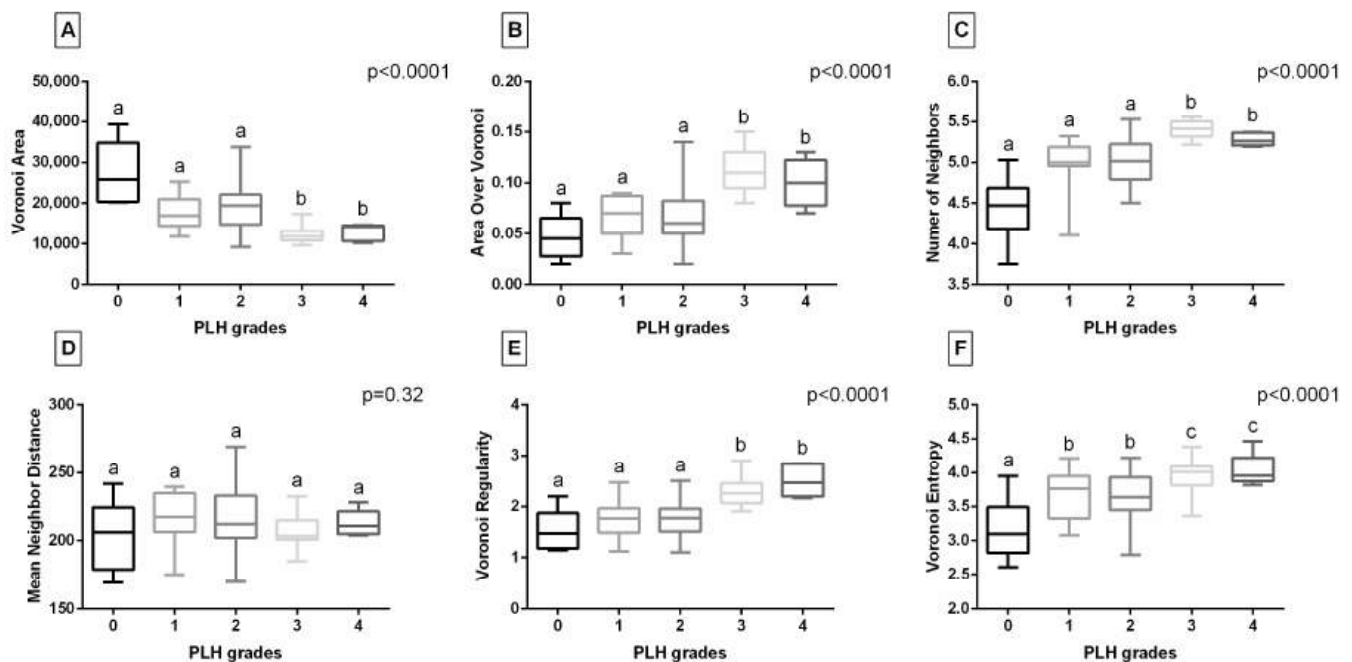


**Figure 3.** Endoscopic image of pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) grade 0 (A,F,K,P,U), grade 1 (B,G,L,Q,V), grade 2 (C,H,M,R,W), grade 3 (D,I,N,S,X), and grade 4 (E,J,O,T,Y), represented by the raw images (A–E), images after contrast enhancement (F–J), images after conversion to grayscale (K–O), images after initial objects detection (P–T), and final images after with refine objects detection (U–Y).

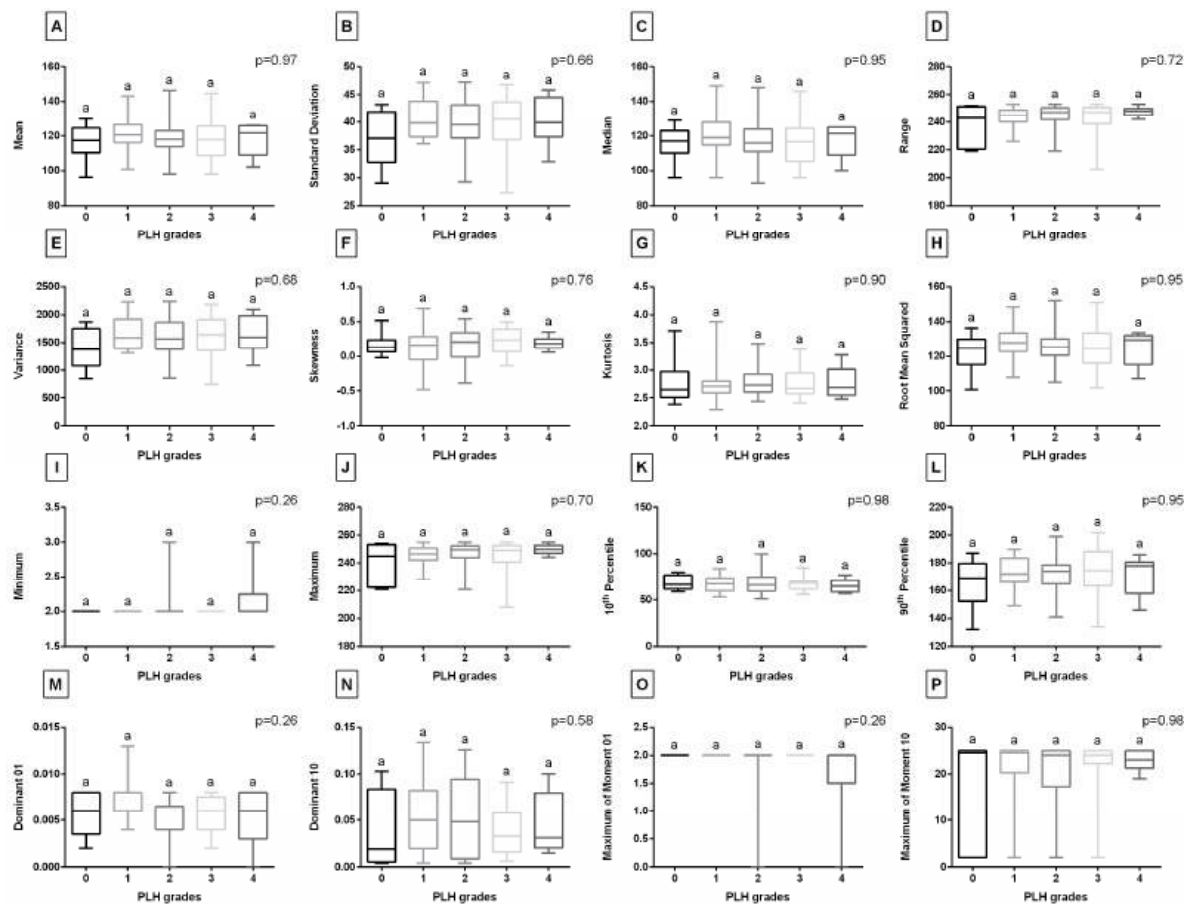
**Table 4.** The Number of Objects representing lymphoid follicles, detected on the endoscopic images, and compared between pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) grades (0–4). Median and range (minimum and maximum values) are provided. Superscript letters indicate differences between PLH grades for  $p < 0.05$ .

| Number of Objects | PLH Grades        |                   |                   |                   |                   |
|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                   | Grade 0           | Grade 1           | Grade 2           | Grade 3           | Grade 4           |
| Median            | 18.0 <sup>a</sup> | 33.0 <sup>a</sup> | 30.5 <sup>a</sup> | 52.5 <sup>b</sup> | 50.5 <sup>b</sup> |
| Range (Min; Max)  | (12.0; 34.0)      | (19.0; 44.0)      | (15.0; 69.0)      | (32.0; 75.0)      | (37.0; 56.0)      |
| $p$ value         | $p < 0.0001$      |                   |                   |                   |                   |

Considering the Voronoi diagram features of the endoscopic images studied (Figure 4), the Voronoi Area was lower in horses with PLH grades 3–4 compared to those with grades 0–2. The Area Over Voronoi, Number of Neighbors, and Voronoi Regularity were higher in horses with PLH grades 3–4 compared to those with grades 0–3. Additionally, Voronoi Entropy was higher in horses with PLH grades 3–4 than those with grades 0–3, as well as higher in horses with PLH grades 1–2 than those with grade 0. No differences were found between PLH grades for Voronoi Regularity. When the digital data set was complemented with the FOS features of the endoscopic images studied (Figure 5), no differences were found between PLH grades.



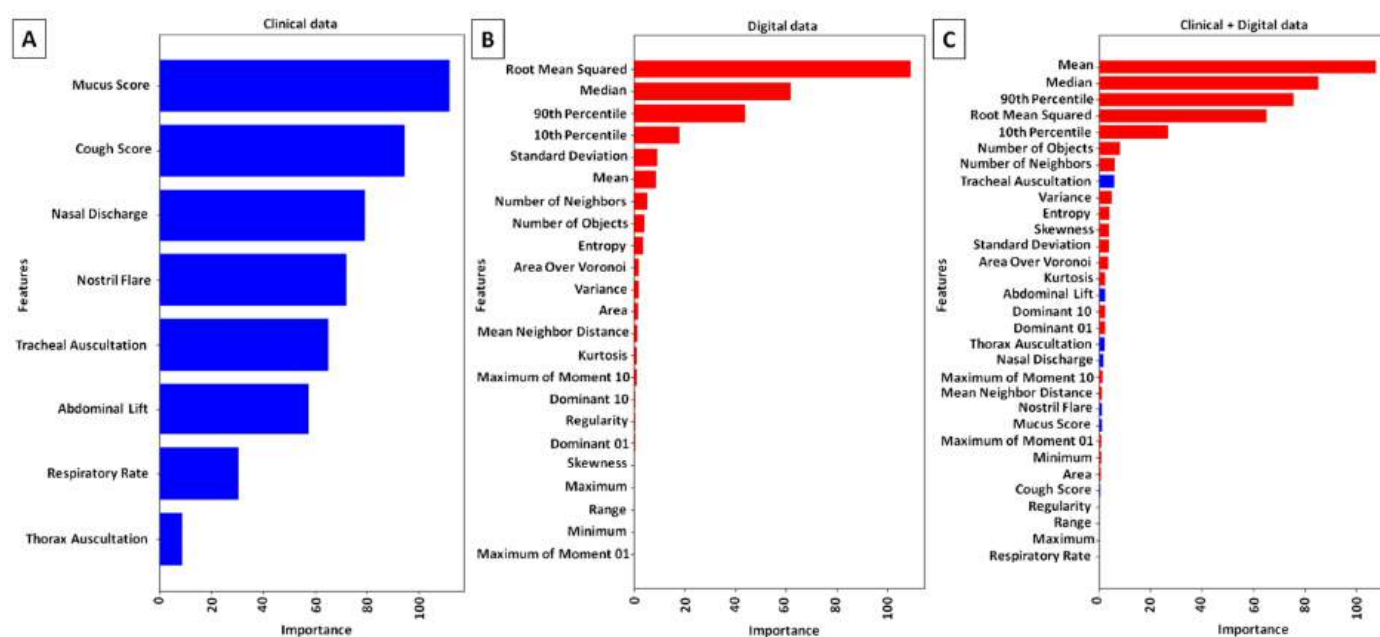
**Figure 4.** Comparison of Voronoi diagram features—Voronoi Area (A), Area Over Voronoi (B), Number of Neighbors (C), Mean Neighbor Distance (D), Voronoi Regularity (E), and Voronoi Entropy (F)—of endoscopic images representing pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) grades (0–4). Boxes represent median and lower and upper quartiles, while whiskers represent minimum and maximum values. Superscript letters indicate differences between PLH grades for  $p < 0.05$ .



**Figure 5.** Comparison of the first-order statistics (FOS) features—Mean (A), Standard Deviation (B), Median (C), Range (D), Variance (E), Skewness (F), Kurtosis (G), Root Mean Squared (H), Minimum (I), Maximum (J), 10th Percentile (K), 90th Percentile (L), Dominant 01 (M), Dominant 10 (N), Maximum of Moment 01 (O), and Maximum of Moment 10 (P)—of endoscopic images representing pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) grades (0–4). Boxes represent median and lower and upper quartiles, while whiskers represent minimum and maximum values. Superscript letters indicate differences between PLH grades for  $p < 0.05$ .

### 3.3. Computer-Aided Diagnosis of PLH

When only the clinical data set was considered in PLH grades classification (Figure 6A), the following endoscopic signs and clinical symptoms had the highest importance for classification results: Mucus Score > Cough Score > Nasal Discharge > Nostril Flare > Tracheal Auscultation. However, this approach provides low classification metrics with 0.47 accuracy, 0.44 precision, 0.44 recall, and 0.41 F1 score (Table 5). When only the digital data set was considered in PLH grades classification (Figure 6B), the following FOS features and Voronoi diagram features had the highest importance for classification results: Root Mean Squared > Median > 90th Percentile > 10th Percentile > Standard Deviation > Mean > Number of Neighbors > Number of Objects. This approach provides higher classification metrics with 0.73 accuracy, 0.70 precision, 0.69 recall, and 0.65 F1 score (Table 5). When the clinical data set was combined with the digital data set for PLH grade classification (Figure 6C), the following FOS features, Voronoi diagram features, and clinical symptoms had the highest importance for the classification results: Mean > Median > 90th Percentile > Root Mean Squared > 10th Percentile > Number of Objects, Number of Neighbors > Tracheal Auscultations. This approach provides the highest classification metrics with 0.76 accuracy, 0.83 precision, 0.78 recall, and 0.76 F1 score (Table 5).



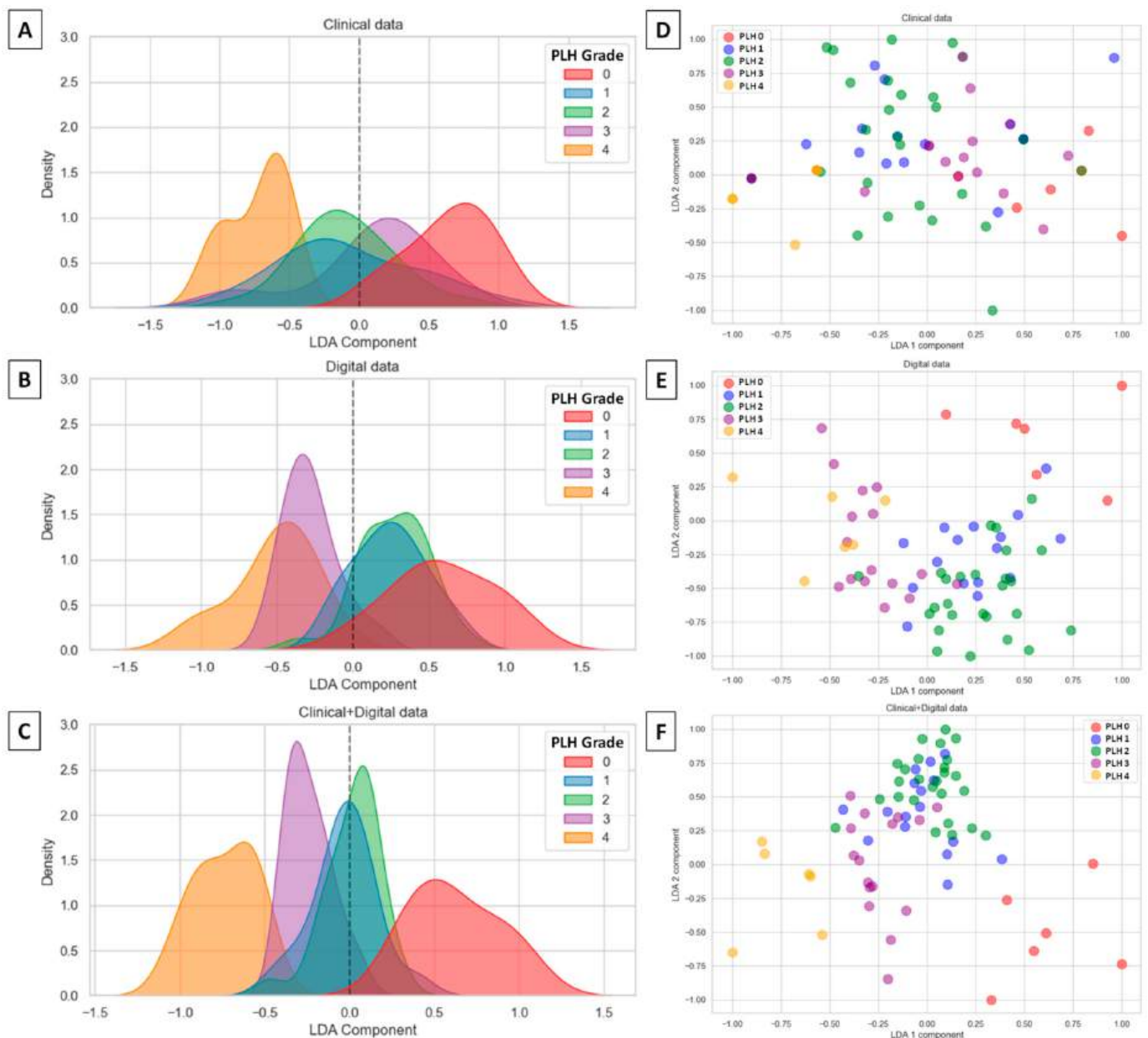
**Figure 6.** Feature importance of pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) classification across three data sets: clinical data (A), digital data (B), as well as clinical and digital data (C). Clinical data are marked in blue, while digital data are marked in red.

**Table 5.** Classification metrics (accuracy, precision, recall, and F1 score) of pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) classification across three data sets: clinical data, digital data, as well as clinical and digital data.

| Classification Metrics | Clinical Data | Digital Data | Clinical + Digital Data |
|------------------------|---------------|--------------|-------------------------|
| Accuracy               | 0.43          | 0.73         | 0.76                    |
| Precision              | 0.44          | 0.70         | 0.83                    |
| Recall                 | 0.44          | 0.69         | 0.78                    |
| F1                     | 0.41          | 0.65         | 0.76                    |

One may observe that distribution of LDA components overlapped the most for the clinical data set, where the classes representing PLH grades 1–3 overlapped (Figure 7A). When the digital data set was considered, two overlaps were observed: PLH grade 3 with grade 4, and PLH grade 1 with grade 2 (Figure 7B). When the clinical data set and the digital data set were combined, only two classes representing PLH grades 1 and 2 overlapped (Figure 7C). The class overlaps were similarly visible in the spatial distribution scatter plots (Figure 7D–F), confirming the best separation between classes for the combined data set (Figure 7F).





**Figure 7.** Distribution (A–C) and spatial distribution (D–F) of linear discriminant analysis (LDA) components of pharyngeal lymphoid hyperplasia (PLH) classification across three data sets: clinical data (A,D), digital data (B,E), as well as clinical and digital data (C,F).

#### 4. Discussion

In this study, a horse-centered approach involves transferring and applying human CAD technology [1,2] to equine veterinary medicine, thereby developing and objectivizing PLH diagnosis and addressing the gap in our understanding of PLH in older horses. Among cohort studies on equine PLH, most have focused on young racehorses [36,42–46,63], with only two studies including horses older than 5 years [32,63]. Sweeney et al. reported PLH in 14% of horses over 5 years old [32], while Wichtel et al. observed PLH in 47% of horses aged 2 to 14 years [63]. Several studies on horses under 5 years old demonstrated that 2-year-old horses exhibited more severe PLH (grades 3–4) compared to 3-year-old and older horses [36,42,44,45]. Similarly, in Wichtel’s study on horses aged 2 to 14 years, those with higher PLH grades were younger than horses with grade 0 PLH [63]. Consistently, in this study on horses over 5 years old, we found that individuals with PLH grades 2, 3, and 4 were significantly younger than those with PLH grade 0. This aligns with the findings

of Robinson et al., who reported that age is the only significant risk factor for PLH [64]. To date, no environmental risk factors have been identified for PLH prevalence. Clarke et al. found no association between poor stable ventilation and the presence or severity of PLH [43], and Auer et al. reported no significant differences in PLH severity among horses from different racetrack stables [42]. Therefore, the benefits of early diagnosis of PLH on broadly understood horses' welfare have not yet been investigated.

Interestingly, only two analytic studies have reported the prevalence of PLH in adult horses that were referred to the equine clinic with respiratory tract diseases. In one study, PLH was observed in 8.2% of adult horses (mean  $\pm$  SD age:  $8.7 \pm 2.6$  years) [33], whereas in another study, PLH was reported in 90.0% of adult horses (mean  $\pm$  SD age:  $12.9 \pm 4.6$  years) [37]. Similarly, in this study, PLH was diagnosed in 91.4% of adult horses referred to our equine clinic with respiratory tract diseases. This large discrepancy in prevalence rates may be explained by methodological differences. In the first study [33], PLH and pharyngitis were counted separately, while in the second study [37], they were considered jointly. Furthermore, the latter study also included 4-year-old horses [37], which could have substantially overestimated PLH prevalence, given that Saulez et al. reported PLH in 63.1% of healthy 4-year-old horses [45].

One may observe that the CDA approach investigates clinical cases rather than subjecting research animals to invasive procedures for pharyngitis induction. On the one hand, experimentally induced disease is not always relevant, as it does not account for the anatomical continuity and histological similarity of airway segments [40,41], which may be associated with the development and progression of PLH [21,31], co-occurring respiratory diseases [34–37], and their clinical symptoms. On the other hand, incorporating clinical cases reduces the use of research animals, which is both beneficial for horses and ethically aligned with an animal-centered approach. Given that this study was conducted on horses exhibiting clinical symptoms of respiratory tract diseases, one may observe that the Mucus Score was higher in horses with PLH grades 2–4 compared to healthy horses. In most previous studies, the amount of tracheal mucus was assessed [43,44], whereas in this study, the amount of mucus on the pharyngeal wall was evaluated. However, our earlier study demonstrated that in horses with PLH, the amount of mucus in both the trachea and pharynx changes in a similar manner across PLH grades [37]. Therefore, the following discussion—although indirect—can be considered to reflect mucus accumulation in the upper airway in general. In one study, no association was found between the presence and severity of PLH and the amount of tracheal mucus [43]. In another study, the severity of PLH degree was associated with the amount of tracheal mucus, such that as PLH degree increased, tracheal Mucus Score increased [44]. Similarly, in our previous study, mucus accumulation in the upper airway—both in the pharynx and trachea—increased in parallel with PLH severity [37]. Such visible mucus accumulation in the trachea may serve as an indicator of inflammatory airway disease (IAD), although only when accompanied by an increased number of inflammatory cells within the mucus [65]. A limitation of this study is that inflammatory cells in the airway mucosa were not assessed. Nevertheless, Holcombe et al. reported an association between PLH grades and macrophage count in tracheal wash, with the number of cells increasing as PLH scores increased [44]. Furthermore, our earlier study showed 20–60% of neutrophils in tracheal wash from 18.3% of horses with PLH grades 1–3, and over 60% of neutrophils in tracheal wash from 58.8% of horses with PLH grades 1–3 [37]. Despite these findings, in the present study, the Mucus Score did not reach sufficient feature importance and was therefore not included in the RF classification model [60,61].

One may observe that the clinical symptoms of respiratory tract diseases were assessed in a standardized manner. To ensure consistency, a previously published clinical symptoms

scoring system was applied [47], and the same team of veterinarians assessed the studied horses. This approach enabled comparison among the 70 horses and demonstrated that the Respiratory Rate, Nasal Discharge, and Cough Score were higher in horses with PLH grade 4 compared to healthy horses. Except for the Cough Score, no similar comparisons have been reported in previous studies. In one study, coughing was not considered a clinical symptom of PLH [44,66], while in another study reported a history of frequent coughing in horses with pharyngitis [33]. Another study highlighted the importance of including PLH in the differential diagnosis of cough, since horses with PLH grades 3–4 were often clinically diagnosed with cough [36]. This finding can be explained by the concept of “unified airways”, which emphasizes the anatomical continuity and functional integration of the respiratory tract [40,41]. Since cough is a reflex triggered by receptor stimulation anywhere along the airways—from the pharynx to the bronchi [67]—irritation of any airway segment can induce a cough. Despite these speculations, in the present study, the Respiratory Rate, Nasal Discharge, and Cough Score did not reach sufficient feature importance and were therefore not included in the RF classification model [60,61].

In only one previous study, abnormal respiratory noise was reported by the owner or trainer in horses with severe PLH. Interestingly, in those cases, PLH was the only respiratory disease detected [68]. Similarly, in this study, Tracheal Auscultation was higher in horses with PLH grades 1 and 4 compared to healthy horses, while Thorax Auscultation was higher in horses with PLH grade 4 compared to healthy horses. Kannegieter et al. suggested that the severity of PLH, along with potential co-occurring respiratory tract diseases, may contribute to respiratory insufficiency. Consequently, the authors recommended including PLH as a possible cause of respiratory insufficiency [68]. In line with this, our results supported the inclusion of one of the respiratory insufficiency symptoms in the PLH classifier. Interestingly, among all the evaluated clinical symptoms and endoscopic signs of respiratory tract diseases, only Tracheal Auscultation demonstrated high feature importance and was therefore incorporated into the RF classification model [60,61]. This combination of clinical data and digital data provided substantially higher classification performance (0.76 accuracy and 0.83 precision) than using either data set alone.

One may observe that when only clinical data were used for PLH classification, the RF algorithm incorporated Mucus Score, Cough Score, Nasal Discharge, and Nostril Flare in addition to Tracheal Auscultation. However, the resulting model demonstrated poor performance (0.43 accuracy and 0.44 precision), which was insufficient to consider CAD effective. By contrast, when only digital data were used, the RF algorithm incorporated six FOS features (Root Mean Squared, Median, both Percentiles, Standard Deviation, Mean) and two Voronoi diagram features (Number of Neighbors, Number of Objects), achieving higher—but still insufficient—classification performance (0.73 accuracy and 0.70 precision). Interestingly, similar FOS features (Mean, Median, both Percentiles, Root Mean Squared) and the same Voronoi diagram features (Number of Neighbors, Number of Objects) were incorporated—together with Tracheal Auscultation—into the best-performing classification model. Notably, the two most representative computational geometry features of lymphoid follicles—their number (Number of Objects) and the number of adjacent follicles (Number of Neighbors) [52–54]—demonstrated high feature importance across competing classification models. These findings suggest that the proposed rise of technologies—specifically, object detection-based processing technique—enables the detection and separation of objects representing the lymphoid follicles within the pharyngeal mucosa. This animal-centered technology may benefit horses by facilitating accelerated screening of a large equine cohort, thereby accurately identifying more horses with PLH, monitoring training of affected young horses, reducing exertion in affected older horses, enabling earlier implementation of appropriate treatment, tracking progression or remission of PLH, supporting

more detailed diagnosis of concurrent airway diseases, and ultimately accelerating recovery while maintaining horse welfare.

Moreover, both the Number of Neighbors and the Number of Objects were higher in horses with PLH grades 3–4 compared to healthy horses and those with PLH grades 1–2. By contrast, none of the FOS features that achieved high feature importance in the RF model significantly differed between PLH grades. This may indicate that pharyngeal wall texture contributes to PLH differentiation; however, it is not sufficiently distinct for robust statistical discrimination. Therefore, further research into alternative image texture evaluation approaches is warranted. Given that the RF algorithm is an ensemble machine learning method that constructs multiple decision trees—each making predictions independently—with final classification determined by majority voting, it is well recognized for its high accuracy in multi-class classification tasks and robustness against overfitting [61,62]. These advantages motivated the RF algorithm selection for the current five-class classification (PLH grades 0–4) using a relatively small dataset of 70 realizations. However, no other supervised machine learning algorithms, such as k-nearest neighbors (kNN) [69,70] or support vector machine (SVM) [71,72], were investigated.

#### *Further Directions and Limitations*

The lack of consideration of alternative image texture evaluation approaches, such as second-order statistics (SOS) [73,74], fractal dimension texture analysis [70], or entropy-based texture analysis, as well as other machine learning algorithms [69–72], represents both a limitation of this study and a direction for further research. Notably, SOS—such as Gray-Level Co-Occurrence Matrix (GLCM) [22,23], Gray-Level Run-Length Matrix (GRLM) [22,23], Gray Level Size Zone Matrix (GLSZM) [23], Gray Level Dependence Matrix (GLDM) [23], or Neighboring Gray Tone Difference Matrix (NGTDM) [23]—and entropy texture features [23,75] have already been successfully applied in previous equine research, suggesting that their application could also be effective in endoscopic image analysis. Moreover, findings from human studies indicate that while FOS/SOS alone may not always achieve optimal classification accuracy [73,74], they often complement other image digitization methods. Higher classification performance is typically obtained in mixed models combining large data sets of FOS, SOS, and other specific digitization methods, such as those based on entropy or fractals or Voronoi diagrams, as proposed in this study.

A second limitation of this study is the lack of consideration of other potentially important co-occurring diseases. One may observe that severe PLH is often indicative of active respiratory tract inflammation [21]. Moreover, this regional inflammation in the upper airway may predispose horses to other diseases of both the upper (nasopharyngeal collapse [34], dorsal displacement of the soft palate [34–36], aryepiglottic fold collapse [34]) and lower (equine asthma [37]) airways. For example, Kaiseler et al. demonstrated that horses with PLH grades 3–4 were more likely to develop dorsal displacement of the soft palate compared to those with PLH grades 1–2, suggesting a probable role of PLH in the etiopathogenesis of dorsal displacement of the soft palate [36]. Although this study included 70 horses, two of the five groups—those with the lowest and highest PLH grades—had relatively small sample sizes. Further stratification to account for the coexistence of the mentioned respiratory tract diseases would require a substantially larger cohort to ensure adequate subgroup representation. Since the primary aim of this study was to evaluate the effectiveness of CAD in PLH classification, only large-scale further studies that incorporate a balanced representation of co-occurring diseases will provide more comprehensive insight into the concept of “unified airways” [40,41].



## 5. Conclusions

Endoscopic signs of PLH may be quantified using Voronoi diagram features and FOS texture features, since the proposed object detection-based processing technique enables the detection and separation of objects representing the lymphoid follicles within the pharyngeal mucosa. In horses older than 5 years old, the proposed protocol of digitizing pharyngeal endoscopic images, combined with digitizing clinical symptoms of respiratory tract diseases, effectively discriminates PLH grades. Therefore, the proposed digitizing of these standard respiratory tract diagnostic methods may support the clinical value of CAD in veterinary medicine, paving the way for further research in digital medical diagnostics.

**Author Contributions:** Conceptualization, N.K. and M.B.; methodology, N.K., M.B. and M.D.; software, M.B. and M.D.; validation, T.J.; formal analysis, N.K., M.B., T.J. and M.D.; investigation, N.K. and M.W.; resources, N.K. and M.B.; data curation, N.K.; writing—original draft preparation, N.K., M.B., T.J. and M.D.; writing—review and editing, N.K., M.B., T.J., M.W. and M.D.; visualization, N.K., M.B. and M.D.; supervision, M.D.; project administration, N.K.; funding acquisition, N.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** The study was performed as part of the projects W/WM-IIB/2/2024 and was partially financed with funds from the Polish Ministry of Science and Higher Education.

**Institutional Review Board Statement:** The research, using the results of veterinary clinical examinations, does not fall under the legislation for the protection of animals used for scientific purposes, national decree—law Dz. U. 2015 poz. 266 and 2010-63—EU directive. No ethical approval was needed.

**Informed Consent Statement:** Written informed consent was obtained from the owners of the animals involved in this study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Mukhtorov, D.; Rakhmonova, M.; Muksimova, S.; Cho, Y.-I. Endoscopic Image Classification Based on Explainable Deep Learning. *Sensors* **2023**, *23*, 3176. [\[CrossRef\]](#)
2. Ahmad, J.; Muhammad, K.; Lee, M.Y.; Baik, S.W. Endoscopic Image Classification and Retrieval Using Clustered Convolutional Features. *J. Med. Syst.* **2017**, *41*, 196. [\[CrossRef\]](#)
3. Yang, X.; Wei, Q.; Zhang, C.; Zhou, K.; Kong, L.; Jiang, W. Colon Polyp Detection and Segmentation Based on Improved MRCNN. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* **2020**, *70*, 4501710. [\[CrossRef\]](#)
4. Ragab, M.; Albukhari, A.; Alyami, J.; Mansour, R.F. Ensemble Deep-Learning-Enabled Clinical Decision Support System for Breast Cancer Diagnosis and Classification on Ultrasound Images. *Biology* **2022**, *11*, 439. [\[CrossRef\]](#)
5. Ashwini, S.; Arunkumar, J.; Prabu, T.; Singh, N.; Singh, N. Diagnosis and Multi-Classification of Lung Diseases in CXR Images Using Optimized Deep Convolutional Neural Network. *Soft Comput.* **2024**, *28*, 6219–6233. [\[CrossRef\]](#)
6. Ozsahin, I.; Sekeroglu, B.; Musa, M.S.; Mustapha, M.T.; Uzun Ozsahin, D. Review on Diagnosis of COVID-19 from Chest CT Images Using Artificial Intelligence. *Comput. Math. Methods Med.* **2020**, *2020*, 9756518. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Cheng, D.; Liu, M.; Fu, J.; Wang, Y. Classification of MR brain images by combination of multi-CNNs for AD diagnosis. In Proceedings of the 9th International Conference on Digital Image Processing (ICDIP 2017), Hong Kong, China, 19–22 May 2017; Volume 10420, p. 1042042.
8. Han, Y.; Ma, Y.; Wu, Z.; Zhang, F.; Zheng, D.; Liu, X.; Tao, L.; Liang, Z.; Yang, Z.; Li, X.; et al. Histologic Subtype Classification of Non-Small Cell Lung Cancer Using PET/CT Images. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2021**, *48*, 350–360. [\[CrossRef\]](#)
9. Kebir, S.; Weber, M.; Lazaridis, L.; Deuschl, C.; Schmidt, T.; Mönninghoff, C.; Keyvani, K.; Umutlu, L.; Pierscianek, D.; Forsting, M.; et al. Hybrid 11C-MET PET/MRI Combined with “Machine Learning” in Glioma Diagnosis According to the Revised Glioma WHO Classification 2016. *Clin. Nucl. Med.* **2019**, *44*, 214–220. [\[CrossRef\]](#)
10. Banik, D.; Roy, K.; Bhattacharjee, D.; Nasipuri, M.; Krejcar, O. Polyp-Net: A Multi-Model Fusion Network for Polyp Segmentation. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* **2020**, *70*, 4000512. [\[CrossRef\]](#)

11. Gaur, P.; Gupta, H.; Chowdhury, A.; Mc Creadie, K.; Pachori, R.B.; Wang, H. A Sliding Window Common Spatial Pattern for Enhancing Motor Imagery Classification in EEG-BCI. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* **2021**, *70*, 4002709. [[CrossRef](#)]
12. Yue, G.; Han, W.; Jiang, B.; Zhou, T.; Cong, R.; Wang, T. Boundary Constraint Network with Cross Layer Feature Integration for Polyp Segmentation. *IEEE J. Biomed. Health Inform.* **2022**, *26*, 4090–4099. [[CrossRef](#)]
13. Yue, G.; Wei, P.; Liu, Y.; Luo, Y.; Du, J.; Wang, T. Automated Endoscopic Image Classification via Deep Neural Network with Class Imbalance Loss. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* **2023**, *72*, 5010611. [[CrossRef](#)]
14. Guo, L.; Yu, X.; Thair, A.; Rideout, A.; Collins, A.; Wang, Z.J.; Hore, M. Deep Learning Model Shows Promise for Detecting and Grading Sesamoiditis in Horse Radiographs. *Am. J. Vet. Res.* **2024**, *85*, ajvr.23.07.0173. [[CrossRef](#)]
15. Turek, B.; Pawlikowski, M.; Jankowski, K.; Borowska, M.; Skierbiszewska, K.; Jasiński, T.; Domino, M. Selection of Density Standard and X-Ray Tube Settings for Computed Digital Absorptiometry in Horses Using the k-Means Clustering Algorithm. *BMC Vet. Res.* **2025**, *21*, 165. [[CrossRef](#)]
16. Borowska, M. *Wprowadzenie do Zastosowania Entropii w Analizie Sygnałów i Obrazów Biomedycznych Oraz Jej Aplikacje w Medycynie i Weterynarii*; Oficyna Wydawnicza Politechniki Białostockiej: Białystok, Poland, 2023; pp. 1–284.
17. Aszteborski, H.; Koneck, K.; Jasiński, T.; Borowska, M.; Lipowicz, P.; Turek, B.; Domino, M. AI-Driven Automatic 3D Segmentation of Equine Maxillary Sinuses—Integrating Convolutional Neural Networks in Veterinary Diagnostic Imaging. In Proceedings of the European Veterinary Diagnostic Imaging Conference (EVDI), Barcelona, Spain, 17–20 September 2025.
18. Bakıcı, C.; Batur, B.; Akgün, R.; Kaya, U.; Ekim, O.; Oto, Ç.; Hazıroğlu, R. Computer-Aided Three Dimensional Morphometric Measurements of Cervical Vertebrae Variations Compared with Manual Measurements in Thoroughbred Horses. *Eurasian J. Vet. Sci.* **2022**, *38*, 41–49. [[CrossRef](#)]
19. Borowska, M.; Lipowicz, P.; Daunoravičienė, K.; Turek, B.; Jasiński, T.; Pauk, J.; Domino, M. Three-Dimensional Segmentation of Equine Paranasal Sinuses in Multidetector Computed Tomography Datasets: Preliminary Morphometric Assessment Assisted with Clustering Analysis. *Sensors* **2024**, *24*, 3538. [[CrossRef](#)]
20. Raker, C.W.; Boles, C.L. Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in the Horse. *J. Equine Med. Surg.* **1978**, *2*, 202–207.
21. Holcombe, S.; Ducharme, N. Disorders of the Nasopharynx and Soft Palate. In *Equine Respiratory Medicine and Surgery*, 1st ed.; McGorum, B., Dixon, P., Robinson, E., Schumacher, J., Eds.; Saunders Elsevier: Philadelphia, PA, USA, 2007; pp. 437–457.
22. Domino, M.; Borowska, M.; Kozłowska, N.; Trojakowska, A.; Zdrojkowski, Ł.; Jasiński, T.; Smyth, G.; Maško, M. Selection of Image Texture Analysis and Color Model in the Advanced Image Processing of Thermal Images of Horses Following Exercise. *Animals* **2022**, *12*, 444. [[CrossRef](#)]
23. Górski, K.; Borowska, M.; Stefanik, E.; Polkowska, I.; Turek, B.; Bereznowski, A.; Domino, M. Selection of Filtering and Image Texture Analysis in the Radiographic Images Processing of Horses' Incisor Teeth Affected by the EOTRH Syndrome. *Sensors* **2022**, *22*, 2920. [[CrossRef](#)]
24. Toutain, M.; Lezoray, O.; Audigié, F.; Busoni, V.; Rossi, G.; Parillo, F.; Elmoataz, A. Analysis of Whole Slide Images of Equine Tendinopathy. In Proceedings of the ICIAR (International Conference on Image Analysis and Recognition), Aveiro, Portugal, 25–27 June 2012; Volume 7325, pp. 440–447.
25. Mair, T.S.; Batten, E.H.; Stokes, C.R.; Bourne, F.J. The Histological Features of the Immune System of the Equine Respiratory Tract. *J. Comp. Pathol.* **1987**, *97*, 575–586. [[CrossRef](#)]
26. McAllister, E.S.; Blakeslee, J.R. Clinical Observations of Pharyngitis in the Horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1977**, *170*, 739–741. [[CrossRef](#)]
27. Holcombe, S.J.; Jackson, C.; Gerber, V.; Jefcoat, A.; Berney, C.; Eberhardt, S.; Robinson, N.E. Stabling Is Associated with Airway Inflammation in Young Arabian Horses. *Equine Vet. J.* **2001**, *33*, 244–249. [[CrossRef](#)]
28. Galan, J.E.; Timoney, J.F. Mucosal Nasopharyngeal Immune Responses of Horses to Protein Antigens of *Streptococcus equi*. *Infect. Immun.* **1985**, *47*, 623–628. [[CrossRef](#)]
29. Breathnach, C.C.; Yeargan, M.R.; Sheoran, A.S.; Allen, G.P. The Mucosal Humoral Immune Response of the Horse to Infective Challenge and Vaccination with Equine Herpesvirus-1 Antigens. *Equine Vet. J.* **2001**, *33*, 651–657. [[CrossRef](#)]
30. Ahern, T.J. Tonsillitis and Tonsillar Hypertrophy Predisposing to Pharyngeal Dysfunction in the Horse. *J. Equine Vet. Sci.* **1997**, *17*, 232–234. [[CrossRef](#)]
31. Holcombe, S.J. *Epidemiology of Airway Inflammation and Mucus in Horses*; AAEP Proceedings; American Association of Equine Practitioners: Lexington, KY, USA, 2005; Volume 51.
32. Sweeney, C.R.; Maxson, A.D.; Soma, L.R. Endoscopic Findings in the Upper Respiratory Tract of 678 Thoroughbred Racehorses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1991**, *198*, 1037–1038. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Gajjarwar, O.S.; Suryawanshi, R.V.; Ulemale, A.H.; Rangnekar, M.N.; Khambatta, P. Prevalence of Upper Respiratory Tract Diseases in Thoroughbred Racehorses. *Haryana Vet.* **2020**, *59*, 14–19.
34. King, D.S.; Tulleners, E.; Martin, B.B.; Parente, E.J.; Boston, R. Clinical Experiences with Axial Deviation of the Aryepiglottic Folds in 52 Racehorses. *Vet. Surg.* **2001**, *30*, 151–160. [[CrossRef](#)]

35. Courouche-Malblanc, A.; Deniau, V.; Rossignol, F.; Corde, R.; Leleu, C.; Maillard, K.; Pitel, P.-H.; Pronost, S.; Fortier, G. Physiological Measurements and Prevalence of Lower Airway Diseases in Trotters with Dorsal Displacement of the Soft Palate. *Equine Vet. J.* **2010**, *42*, 246–255. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Kaiseler, P.H.; Dzyekanski, B.; Schiefelbein, R.; Silveira, R.G.; Pimpão, C.T.; Michelotto, P.V., Jr. Upper Airway Evaluations of Thoroughbred Racehorses in a Private Clinic in Curitiba, Brazil—Resitng Endoscopic Findings in 587 Horses. *Arch. Vet. Sci.* **2012**, *17*, 1–9. [\[CrossRef\]](#)
37. Kozłowska, N.; Wierzbicka, M.; Jasiński, T.; Domino, M. Co-Occurrence of Equine Asthma and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Pleasure Horses. *Agriculture* **2024**, *14*, 1157. [\[CrossRef\]](#)
38. Wilkins, P.A. Lower Airway Diseases of the Adult Horse. *Vet. Clin. Equine Pract.* **2003**, *19*, 101–121. [\[CrossRef\]](#)
39. Grossman, J. One Airway, One Disease. *Chest* **1997**, *111*, 11S–16S. [\[CrossRef\]](#)
40. Giovannini-Chami, L.; Paquet, A.; Sanfiorenzo, C.; Pons, N.; Cazareth, J.; Magnone, V.; Lebrigand, K.; Chevalier, B.; Vallauri, A.; Julia, V.; et al. The “One Airway, One Disease” Concept in Light of Th2 Inflammation. *Eur. Respir. J.* **2018**, *52*, 1800437. [\[CrossRef\]](#)
41. Holcombe, S. Upper Airway Function of Normal Horses during Exercise. In *Equine Exercise Physiology: The Science of Exercise in the Athletic Horse*, 1st ed.; Hinchcliff, K.W., Geor, R.J., Kaneps, A.J., Eds.; Elsevier: Saunder, UK; St. Louis, MO, USA, 2008; pp. 170–192.
42. Auer, D.E.; Wilson, R.G.; Groenendyk, S. Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Thoroughbred Racehorses in Training. *Aust. Vet. J.* **1985**, *62*, 124–126. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Clarke, A.F.; Madelin, T.M.; Allpress, R.G. The Relationship of Air Hygiene in Stables to Lower Airway Disease and Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia in Two Groups of Thoroughbred Horses. *Equine Vet. J.* **1987**, *19*, 524–530. [\[CrossRef\]](#)
44. Holcombe, S.J.; Robinson, N.E.; Derksen, F.J.; Bertold, B.; Genovese, R.; Miller, R.; de Feiter Rupp, H.; Carr, E.A.; Eberhart, S.W.; Boruta, D.; et al. Effect of Tracheal Mucus and Tracheal Cytology on Racing Performance in Thoroughbred Racehorses. *Equine Vet. J.* **2006**, *38*, 300–304. [\[CrossRef\]](#)
45. Saulez, M.N.; Gummow, B. Prevalence of Pharyngeal, Laryngeal and Tracheal Disorders in Thoroughbred Racehorses, and Effect on Performance. *Vet. Rec.* **2009**, *165*, 431–435. [\[CrossRef\]](#)
46. Bagshaw, J.; Sanz, M.; Wang, Y.; Shoemaker, S.; Bayly, W. Severity and Effects of Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia Vary with Age and Racetrack Location in Thoroughbred Racehorses. *Comp. Exerc. Physiol.* **2023**, *19*, 449–460. [\[CrossRef\]](#)
47. Kozłowska, N.; Wierzbicka, M.; Pawliński, B.; Domino, M. Co-Occurrence of Severe Equine Asthma and Palatal Disorders in Privately Owned Pleasure Horses. *Animals* **2023**, *13*, 1962. [\[CrossRef\]](#)
48. Fjeldborg, J.; Lindegaard, C.; van Erck-Westergren, E.; Strand, E.; Hackett, E. Endoscopic Examination of the Respiratory Tract. In *Equine Respiratory Endoscopy*; CABI Books: Wallingford, UK, 2024; pp. 35–62.
49. Hunter, R.S. Photoelectric Color Difference Meter. *J. Opt. Soc. Am.* **1958**, *48*, 985–995. [\[CrossRef\]](#)
50. Zuiderveld, K. Contrast Limited Adaptive Histogram Equalization. In *Graphics Gems IV*; Academic Press Professional, Inc.: Cambridge, MA, USA, 1994; pp. 474–485.
51. Dobrin, A. *A Review of Properties and Variations of Voroni Diagrams*; Whitman College: Walla Walla, WA, USA, 2005; pp. 1–43.
52. Huang, Z.; Huang, G.; Cheng, L. Medical Image Segmentation of Blood Vessels Based on Clifford Algebra and Voronoi Diagram. *J. Softw.* **2018**, *13*, 360–373. [\[CrossRef\]](#)
53. Sudbø, J.; Marcelpoil, R.; Reith, A. New Algorithms Based on the Voronoi Diagram Applied in a Pilot Study on Normal Mucosa and Carcinomas. *Anal. Cell. Pathol.* **2000**, *21*, 389361. [\[CrossRef\]](#)
54. Lau, C.; Kalantari, B.; Batts, K.P.; Ferrell, L.D.; Nyberg, S.L.; Graham, R.P.; Moreira, R.K. The Voronoi Theory of the Normal Liver Lobular Architecture and Its Applicability in Hepatic Zonation. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 9343. [\[CrossRef\]](#)
55. Lin, W.; Gao, Q.; Du, M.; Chen, W.; Tong, T. Multiclass Diagnosis of Stages of Alzheimer’s Disease Using Linear Discriminant Analysis Scoring for Multimodal Data. *Comput. Biol. Med.* **2021**, *134*, 104478. [\[CrossRef\]](#)
56. Adebiyi, M.O.; Arowolo, M.O.; Mshelia, M.D.; Olugbara, O.O. A Linear Discriminant Analysis and Classification Model for Breast Cancer Diagnosis. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 11455. [\[CrossRef\]](#)
57. Rezaei, Z. A Review on Image-Based Approaches for Breast Cancer Detection, Segmentation, and Classification. *Expert Syst. Appl.* **2021**, *182*, 115204. [\[CrossRef\]](#)
58. Bechelli, S.; Delhommelle, J. Machine Learning and Deep Learning Algorithms for Skin Cancer Classification from Dermoscopic Images. *Bioengineering* **2022**, *9*, 97. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
59. Pedregosa, F.; Varoquaux, G.; Gramfort, A.; Michel, V.; Thirion, B.; Grisel, O.; Blondel, M.; Prettenhofer, P.; Weiss, R.; Dubourg, V.; et al. Scikit-Learn: Machine Learning in Python. *J. Mach. Learn. Res.* **2011**, *12*, 2825–2830.
60. Babenko, V.; Nastenka, I.; Pavlov, V.; Horodetska, O.; Dykan, I.; Tarasyuk, B.; Lazoryshinets, V. Classification of Pathologies on Medical Images Using the Algorithm of Random Forest of Optimal-Complexity Trees. *Cybern. Syst. Anal.* **2023**, *59*, 346–358. [\[CrossRef\]](#)

61. Jasti, V.D.P.; Zamani, A.S.; Arumugam, K.; Naved, M.; Pallathadka, H.; Sammy, F.; Raghuvanshi, A.; Kaliyaperumal, K. Computational Technique Based on Machine Learning and Image Processing for Medical Image Analysis of Breast Cancer Diagnosis. *Secur. Commun. Netw.* **2022**, *2022*, 1918379. [[CrossRef](#)]
62. Breiman, L. Random Forests. *Mach. Learn.* **2001**, *45*, 5–32. [[CrossRef](#)]
63. Wichtel, M.; Gomez, D.; Burton, S.; Wichtel, J.; Hoffman, A. Relationships between Equine Airway Reactivity Measured by Flowmetric Plethysmography and Specific Indicators of Airway Inflammation in Horses with Suspected Inflammatory Airway Disease. *Equine Vet. J.* **2016**, *48*, 466–471. [[CrossRef](#)]
64. Robinson, N.E.; Berney, C.; Behan, A.; Derksen, F.J. Fluticasone Propionate Aerosol Is More Effective for Prevention than Treatment of Recurrent Airway Obstruction. *J. Vet. Intern. Med.* **2009**, *23*, 1247–1253. [[CrossRef](#)]
65. Couetil, L.L.; Rosenthal, F.S.; DeNicola, D.B.; Chilcoat, C.D. Clinical Signs, Evaluation of Bronchoalveolar Lavage Fluid, and Assessment of Pulmonary Function in Horses with Inflammatory Respiratory Disease. *Am. J. Vet. Res.* **2001**, *62*, 538–546. [[CrossRef](#)]
66. Robinson, N.E.; Karmaus, W.; Holcombe, S.J.; Carr, E.A.; Derksen, F.J. Airway Inflammation in Michigan Pleasure Horses: Prevalence and Risk Factors. *Equine Vet. J.* **2006**, *38*, 293–299. [[CrossRef](#)]
67. Couëtil, L.L.; Hoffman, A.M.; Hodgson, J.; Buechner-Maxwell, V.; Viel, L.; Wood, J.L.N.; Lavoie, J.-P. Inflammatory Airway Disease of Horses. *J. Vet. Intern. Med.* **2007**, *21*, 356–361. [[CrossRef](#)]
68. Kannegieter, N.J.; Dore, M.L. Endoscopy of the Upper Respiratory Tract during Treadmill Exercise: A Clinical Study of 100 Horses. *Aust. Vet. J.* **1995**, *72*, 101–107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Xing, X.; Jia, X.; Meng, M.-H.Q. Bleeding Detection in Wireless Capsule Endoscopy Image Video Using Superpixel-Color Histogram and a Subspace KNN Classifier. In Proceedings of the 1st International Conference on Advances in Science, Engineering and Robotics Technology 2019, Dhaka, Bangladesh, 3–5 May 2019; Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.: New York, NY, USA, 2019.
70. Bębas, E.; Pauk, K.; Pauk, J.; Daunoravičienė, K.; Mojsak, M.; Hładuński, M.; Domino, M.; Borowska, M. Application of Fractal Radiomics and Machine Learning for Differentiation of Non-Small Cell Lung Cancer Subtypes on PET/MR Images. *J. Clin. Med.* **2025**, *14*, 5776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Li, B.; Meng, M.Q.-H. Tumor Recognition in Wireless Capsule Endoscopy Images Using Textural Features and SVM-Based Feature Selection. *IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed.* **2012**, *16*, 323–329. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Bębas, E.; Borowska, M.; Derlatka, M.; Oczeretko, E.; Hładuński, M.; Szumowski, P.; Mojsak, M. Machine-Learning-Based Classification of the Histological Subtype of Non-Small-Cell Lung Cancer Using MRI Texture Analysis. *Biomed. Signal Process. Control* **2021**, *66*, 102446. [[CrossRef](#)]
73. Hossain, M.R.I.; Ahmed, I.; Kabir, M. Automatic Lung Tumor Detection Based on GLCM Features. In *Computer Vision, Proceedings of the ACCV 2014 Workshops, Singapore, 1–2 November 2014*; Jawahar, C.V., Shan, S., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 109–121.
74. Adi, K.; Widodo, C.E.; Widodo, A.P.; Gernowo, R.; Pamungkas, A.; Syifa, R.A. Detection Lung Cancer Using Gray Level Co-Occurrence Matrix (GLCM) and Back Propagation Neural Network Classification. *J. Eng. Sci. Technol. Rev.* **2018**, *11*, 8–12. [[CrossRef](#)]
75. Domino, M.; Borowska, M.; Zdrojkowski, Ł.; Jasiński, T.; Sikorska, U.; Skibniewski, M.; Maško, M. Application of the Two-Dimensional Entropy Measures in the Infrared Thermography-Based Detection of Rider: Horse Bodyweight Ratio in Horseback Riding. *Sensors* **2022**, *22*, 6052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

## **Oświadczenia współautorów publikacji [P.4]**



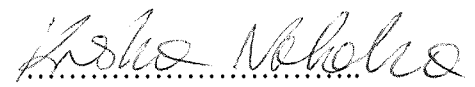
Warszawa, 30.09.2025 r.

lek. wet. Natalia Kozłowska  
natalia\_kozłowska@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Borowska, M., Jasiński, T., Wierzbicka, M., & Domino, M. (2025). Computer-Aided Diagnosis of Equine Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia Using the Object Detection-Based Processing Technique of Digital Endoscopic Images. Animals, 15(18), 2758* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań, udziale w opracowaniu metody badawczej, zapewnieniu zasobów do realizacji badań, udziale w przeprowadzeniu badań, przechowywaniu danych, udziale w przygotowaniu wizualizacji, zarządzaniu projektem, udziale w przygotowaniu szkicu manuskryptu, udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu oraz pozyskaniu finansowania badań.

  
(Podpis)



Warszawa, 30.09.2025 r.

Dr hab. inż. Marta Borowska  
m.borowska@pb.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Borowska, M., Jasiński, T., Wierzbicka, M., & Domino, M. (2025). Computer-Aided Diagnosis of Equine Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia Using the Object Detection-Based Processing Technique of Digital Endoscopic Images. Animals, 15(18), 2758* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu koncepcji badań oraz metody badawczej, zapewnieniu zasobów i oprogramowania do realizacji badań, udziale w analizie danych, udziale w przygotowaniu wizualizacji, udziale w przygotowaniu szkicu manuskryptu, udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu.

Marta Borowska  
(Podpis)



Warszawa, 30.09.2025 r.

Dr Tomasz Jasiński  
tomasz\_jasinski@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Borowska, M., Jasiński, T., Wierzbicka, M., & Domino, M. (2025). Computer-Aided Diagnosis of Equine Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia Using the Object Detection-Based Processing Technique of Digital Endoscopic Images. Animals, 15(18), 2758* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w analizie danych, udziale w walidacji uzyskanych wyników, udziale w przygotowaniu szkicu, edycji oraz recenzowaniu manuskryptu.

.....  
(Podpis)

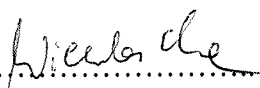
Warszawa, 30.09.2025 r,

Dr Małgorzata Wierzbicka  
malgorzata\_wierzbicka@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Borowska, M., Jasiński, T., Wierzbicka, M., & Domino, M. (2025). Computer-Aided Diagnosis of Equine Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia Using the Object Detection-Based Processing Technique of Digital Endoscopic Images. Animals, 15(18), 2758* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w przeprowadzeniu badań oraz udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu.

.....  
(Podpis)

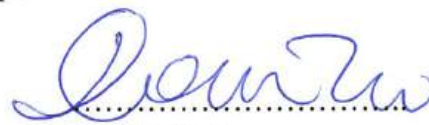
Warszawa, 30.09.2025 r.

Dr hab. Małgorzata Domino, prof. uczelni  
malgorzata\_domino@sggw.edu.pl

**Rada Dyscypliny Weterynaria  
Szkoły Głównej Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie**

### **Oświadczenie o współautorstwie**

Niniejszym oświadczam, że w pracy: *Kozłowska, N., Borowska, M., Jasiński, T., Wierzbicka, M., & Domino, M. (2025). Computer-Aided Diagnosis of Equine Pharyngeal Lymphoid Hyperplasia Using the Object Detection-Based Processing Technique of Digital Endoscopic Images. Animals, 15(18), 2758* mój indywidualny wkład w jej powstanie polegał na: udziale w opracowaniu metody badawczej, zapewnieniu oprogramowania do realizacji badań, udziale w analizie danych, udziale w przygotowaniu wizualizacji, udziale w przygotowaniu szkicu manuskryptu, udziale w edytowaniu i recenzowaniu manuskryptu oraz udziale w nadzorze nad pracą zespołu.



(Podpis)



Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW.

Karolina Notkiewicz

(czytelny podpis autora)