

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Nikola S. Topalović

**POVEZANOST STRUKTURNE
ORGANIZACIJE HROMATINA
NEUTROFILNIH GRANULOCITA
PERIFERNE KRVI, MENTALNOG
DISTRESA I INTENZITETA FIZIČKE
AKTIVNOSTI SPORTISTA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Nikola S. Topalovic

**ASSOCIATION OF STRUCTURAL
ORGANIZATION OF CHROMATIN OF
NEUTROPHIL GRANULOCYTES OF
PERIPHERAL BLOOD, MENTAL
DISTRESS AND INTENSITY OF
PHYSICAL ACTIVITY OF ATHLETES**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2023.

Mentori doktorske disertacije:

Prof. dr Igor Pantić, vanredni profesor i naučni savetnik
Institut za Medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Olivera Vuković, vanredni profesor
Institut za mentalno zdravlje, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Sanja Mazić, redovni profesor
Institut za Medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Dejan Nešić, redovni profesor
Institut za medicinsku fiziologiju „Rihard Burijan“, Medicinski fakultet,
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr Ivana Stašević-Karličić, vanredni profesor
Medicinski fakultet, Univerzitet u Prištini, sedište u Kosovskoj Mitrovici

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Zahvaljujem se koautorima rada koji je proizišao kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske disertacije jer su učestvovali u:

1. Kreiranju koncepta teze: prof. dr Igor Pantić, prof. dr Sanja Mazić
2. Metodologiji: prof. dr Igor Pantić, prof. dr Sanja Mazić, prof. dr Dejan Nešić
3. Formalnoj analizi: prof. dr Igor Pantić, prof. dr Ivana Stašević – Karličić
4. Istraživanju: prof dr. Dejan Nešić, doc. dr Darko Laketić
5. Prikupljanju podataka: prof. dr Sanja Mazić, klin. asist. dr Jelena Čumić
6. Superviziji: prof. dr Olivera Vuković
7. Pisanju – originalni nacrt: prof. dr Igor Pantić
8. Pisanju – recenzija i uređivanje: prof. dr Sanja Mazić

POVEZANOST STRUKTURNE ORGANIZACIJE HROMATINA NEUTROFILNIH GRANULOCITA PERIFERNE KRVI, MENTALNOG DISTRESA I INTENZITETA FIZIČKE AKTIVNOSTI SPORTISTA

Sažetak

Uvod: Imunski sistem, kao i pojedini aspekti inflamacije nastali kao posledica neadekvatnog funkcionisanja imunskog sistema, mogu biti asocirani sa mentalnim distresom. Izmenjen fiziološki neuroendokrini odgovor koji nastaje kao posledica mentalnog distresa može uticati na dinamiku i funkcionalne sposobnosti neutrofila (fagocitozu, pokretljivost, hemotaksu, produkciju pro i anti-inflamatornih citokina), kao i na strukturne promene ćelijskog jedra ovih ćelija. Iako je dokazano da postoji dozno-zavisni odgovor između intenziteta fizičke aktivnosti i funkcije imunskog sistema, njihova međusobna interakcija je kompleksna, i dalje nedovoljno istražena. Takođe, fizička aktivnost može biti jedan od načina prevencije i terapije mentalnog distresa. Teksturalna analiza ćelijskog jedra, metoda korišćena u istraživanju, predstavlja kompleksni matematički i kompjuterski algoritam kojom se mogu kvantifikovati diskretne promene u strukturi i distribuciji hromatina nastale pod uticajem različitih stimulusa.

Cilj istraživanja je bio ispitivanje uticaja mentalnog distresa i različitog intenziteta fizičke aktivnosti sportista na promene teksturalnih parametara strukture i distribucije hromatina neutrofilnih granulocita periferne krvi, kao i da se predloži model zasnovan na metodama veštačke inteligencije i mašinskog učenja koji bi mogao da predvidi postojanje mentalnog distresa na osnovu parametara strukturne organizacije hromatina neutrofilnih granulocita.

Materijal i metode: Studija preseka je obavljena na uzorku od 100 zdravih sportista, studenata Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. U studiji je učestvovalo 60 ispitanika muškog pola i 40 ispitanica ženskog pola. Ispitanici su podeljeni na dve grupe na osnovu rezultata dobijenih popunjavanjem prethodno validiranih upitnika. Prvi kriterijum za podelu ispitanika bili su rezultati dobijeni analizom strukturisanog upitnika o proceni mentalnog distresa. Drugi kriterijum koji je bio korišćen za klasifikaciju ispitanika na grupe je procena intenziteta fizičke aktivnosti, na osnovu rezultata dobijenih analizom međunarodnog upitnika fizičke aktivnosti. Osnovne demografske i anamnestičke podatke o svakom ispitaniku smo sakupljali kroz standardizovani sportsko-medicinski upitnik. Nakon antropometrijskih merenja i kompletnog fizikalnog pregleda ispitanika, svaki od ispitanika je bio zamoljen da popuni strukturisani upitnik za procenu mentalnog distresa koji se sastojao od 3 dela. Prvi deo upitnika je predstavljala skala depresivnosti, anksioznosti i stresa DASS-21 (*Depression Anxiety Stress Scales*). Drugi deo upitnika je predstavljala skala za procenu generalizovane anksioznosti GAD-7 (*Generalized Anxiety Disorder*). Treći deo upitnika je obuhvatio skalu emocionalne regulacije ERQ (*Emotion Regulation Questionnaire*). Za procenu intenziteta fizičke aktivnosti koristili smo kratku formu Međunarodnog upitnika o fizičkoj aktivnosti IPAQ (*International Physical Activity Questionnaire*). Zatim je od svakog ispitanika uzeta kap periferne krvi iz jagodice prsta.

Krvni razmazi su bili fiksirani u apsolutnom metanolu, a zatim obojeni modifikacijom Gimza metode u skladu sa preporučenim protokolom proizvođača Sigma-Aldrich. Nakon vizualizacije hromatinskih struktura i stvaranja digitalnih mikrografa, pristupilo se teksturalnoj analizi koja se zasnivala na metodi matrice simultanog ko-pojavljivanja sivih vrednosti rezolucionih jedinica GLCM (*engl. „Gray Level Co-occurrence Matrix analysis“*). Primenjen je kompleksni matematički algoritam zasnovan na statistici drugog reda i izračunate su sledeće vrednosti: angularni drugi momenat (indikator teksturalne uniformnosti), inverzni momenat razlike (indikator teksturalne homogenosti), GLCM kontrast, teksturalna korelacija i GLCM varijansa.

Rezultati: Detektovana je statistički visoko značajna negativna korelacija između vrednosti inverznog momenta razlike i angularnog drugog momenta jedarne strukture neutrofilnih granulocita i DASS-21 skora, kao i nivoa anksioznosti merene GAD-7 skalom. GLCM kontrast je bio pozitivno povezan sa ova dva skora, a povezanost je takođe bila statistički visoko značajna. Nije utvrđena statistički značajna korelacija skorova dobijenih analizom DASS-21 i GAD-7 skale i ostalih parametra GLCM analize. Kada su u pitanju rezultati vezani za emocionalnu regulaciju, nije utvrđena statistički značajna povezanost između nivoa kognitivne preformulacije i emocionalne supresije ni sa jednim GLCM indikatorom jedarne strukture neutrofilnih granulocita. Nakon obavljene korelacione analize, nije detektovana statistički značajna povezanosti između skorova za fizičku aktivnost i depresije, anksioznosti i stresa kao komponentni mentalnog distresa kod ispitanika. Takođe, nije bilo statistički značajne povezanosti između intenziteta fizičke aktivnosti i stepena kognitivne preformulacije, odnosno emocionalne supresije. Utvrđeno je da ne postoji statistički značajna povezanost između teksturalnih parametara jedarne strukture hromatina neutrofilnih granulocita i skorova za procenu intenziteta fizičke aktivnosti. Ovo se odnosi kako na parametre homogenosti (angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike) tako i na ostale GLCM indikatore (teksturalni kontrast, korelacija i varijansa). Nakon predlaganja tri modela mašinskog učenja zasnovanih na algoritmu „slučajnih šuma“, „Gradient Boosting“ regresorskom algoritmu i „Support Vector Machine“ regresorskom algoritmu, model zasnovan na algoritmu „slučajnih šuma“ je pokazao najbolje procenite tačnosti prilikom predviđanja nivoa anksioznosti kvantifikovanog GAD-7 testom.

Zaključci: Mentalni distres statistički značajno utiče na vrednosti inverznog momenta razlike i angularnog drugog momenta, kao i na vrednosti GLCM kontrasta. Nije utvrđena statistički značajna povezanost između nivoa mentalnog distresa i GLCM varijanse, kao i teksturalne korelacije. Intenzitet fizičke aktivnosti nije u statistički značajnoj korelaciji sa teksturalnim parametrima hromatinske strukture neutrofilnih granulocita, niti utiče na nivo mentalnog distresa kod univerzitetskih sportista. Metode mašinskog učenja u budućnosti teorijski mogu biti deo biomarkera koji će se koristiti za brzo detektovanje mentalnog distresa kod sportista.

Ključne reči: neutrofili, hromatin, mentalni distres, teksturalna analiza, GLCM parametri, fizička aktivnosti, sportista

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Primenjena istraživanja u medicini sporta i motornim veštinama

UDK broj:

CONNECTION BETWEEN STRUCTURAL ORGANIZATION OF CHROMATIN IN NEUTROPHIL GRANULOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD, MENTAL DISTRESS AND INTENSITY OF PHYSICAL ACTIVITY IN ATHLETES

Abstract

Introduction: The immune system, as well as certain aspects of inflammation resulting from pathological functioning of the immune system, can be associated with mental distress. The altered physiological neuroendocrine response that occurs as a result of mental distress can affect the dynamics and functional abilities of neutrophils (phagocytosis, motility, chemotaxis, production of pro- and anti-inflammatory cytokines), as well as structural changes in the cell nucleus of these cells. Although it has been proven that there is a dose-dependent response between the intensity of physical activity and the functioning of the immune system, their mutual interaction is still complex and insufficiently researched. Also, physical activity can be one of the ways for the prevention and therapy of mental distress. Textural analysis of the cell nucleus, the method used in the research, is a complex mathematical and computer algorithm that can be used to quantify discrete changes in the structure and distribution of chromatin caused by various stimuli.

Aim of the research was to examine the influence of mental distress and different intensity of physical activity of athletes on changes in the textural parameters of the structure and distribution of chromatin of peripheral blood neutrophil granulocytes, as well as to propose a model based on artificial intelligence and machine learning methods that could predict the existence of mental distress on basis of structural organization parameters of chromatin of neutrophil granulocytes.

Methods: A cross-sectional study was conducted on a sample of 100 healthy athletes, students of the Faculty of Medicine, University of Belgrade. The study participated 60 male and 40 female subjects. Subjects were divided into two groups based on the results obtained by completing previously validated questionnaires. The first criterion for the distribution of subjects was the results obtained from the analysis of a structured questionnaire on the assessment of mental distress. Another criterion that was used to classify subjects into groups is the assessment of the intensity of physical activity, based on the results obtained from the analysis of a validated international physical activity questionnaire. We collected basic anamnestic data about each subject through a standardized sports medicine questionnaire. After anthropometric measurements and a complete physical examination of the subjects, each of the subjects was asked to fill out a structured questionnaire for the assessment of mental distress, which consisted of 3 parts. The first part of the questionnaire was the depression, anxiety and stress scale DASS-21 (*Depression Anxiety Stress Scales*). The second part of the questionnaire was the scale for assessing generalized anxiety GAD-7 (*Generalized Anxiety Disorder*). The third part of the questionnaire included the emotional regulation scale ERQ (*Emotion Regulation Questionnaire*). To assess the intensity of physical activity, we used the short form of the International

Physical Activity Questionnaire IPAQ (*International Physical Activity Questionnaire*). Then, a drop of peripheral blood was taken from each subject. Blood smears were fixed in absolute methanol and then stained using a modification of the Giemsa method according to the recommended protocol of the manufacturer Sigma-Aldrich. After visualization of chromatin structures and creation of digital micrographs, a textural analysis based on the gray level co-occurrence matrix analysis (GLCM) method was started. A complex mathematical algorithm based on second-order statistics was applied and the following values were calculated: angular second moment (indicator of textural uniformity), inverse difference moment (indicator of textural homogeneity), GLCM contrast, textural correlation and GLCM variance.

Results: A statistically highly significant negative correlation was detected between the value of the inverse difference moment and the angular second moment of the nuclear structure of neutrophil granulocytes and the DASS-21 score, as well as the level of anxiety measured by the GAD-7 scale. GLCM contrast was positively associated with these two scores, and the association was also statistically highly significant. There was no statistically significant correlation between the scores obtained by analysing the DASS-21 and GAD-7 scales and other parameters of the GLCM analysis. When it comes to the results related to emotional regulation, no statistically significant association was established between the level of cognitive reformulation and emotional suppression with any GLCM indicator of the nuclear structure of neutrophil granulocytes. After the correlation analysis, no statistically significant correlation was detected between the scores for physical activity and the level of anxiety, depression, and mental distress in the subjects. Also, there was no statistically significant connection between the intensity of physical activity and the degree of cognitive preformulating, or emotional suppression. It was determined that there is no statistically significant relationship between the textural parameters of the nuclear structure of the chromatin of neutrophil granulocytes and the scores for assessing the intensity of physical activity. This applies both to homogeneity parameters (angular second moment and inverse difference moment) and to other GLCM indicators (textural contrast, correlation, and variance). After proposing three machine learning models based on the "random forest" algorithm, the "Gradient Boosting" regressor algorithm and the "Support Vector Machine" regressor algorithm, the model based on the "random forest" algorithm showed the best percentage of accuracy when predicting the level of anxiety quantified by the GAD-7 test .

Conclusions: Mental distress statistically significantly affects the values of the inverse moment of the difference and the angular second moment, as well as the values of the GLCM contrast. No statistically significant correlation was found between the level of mental distress and GLCM variance, as well as textural correlation. Intensity of physical activity is not statistically significantly correlated with the textural parameters of the chromatin structure of neutrophil granulocytes, nor does it affect the level of mental distress in university athletes. In the future, machine learning methods may be biomarkers that will be used to quickly detect mental distress in athletes.

Key words: neutrophils, chromatin, mental distress, textural analysis, GLCM parameters, physical activity, athletes

Research area: Medicine

Research filed: Applied research in sports medicine and motor skills

UDK number

SADRŽAJ

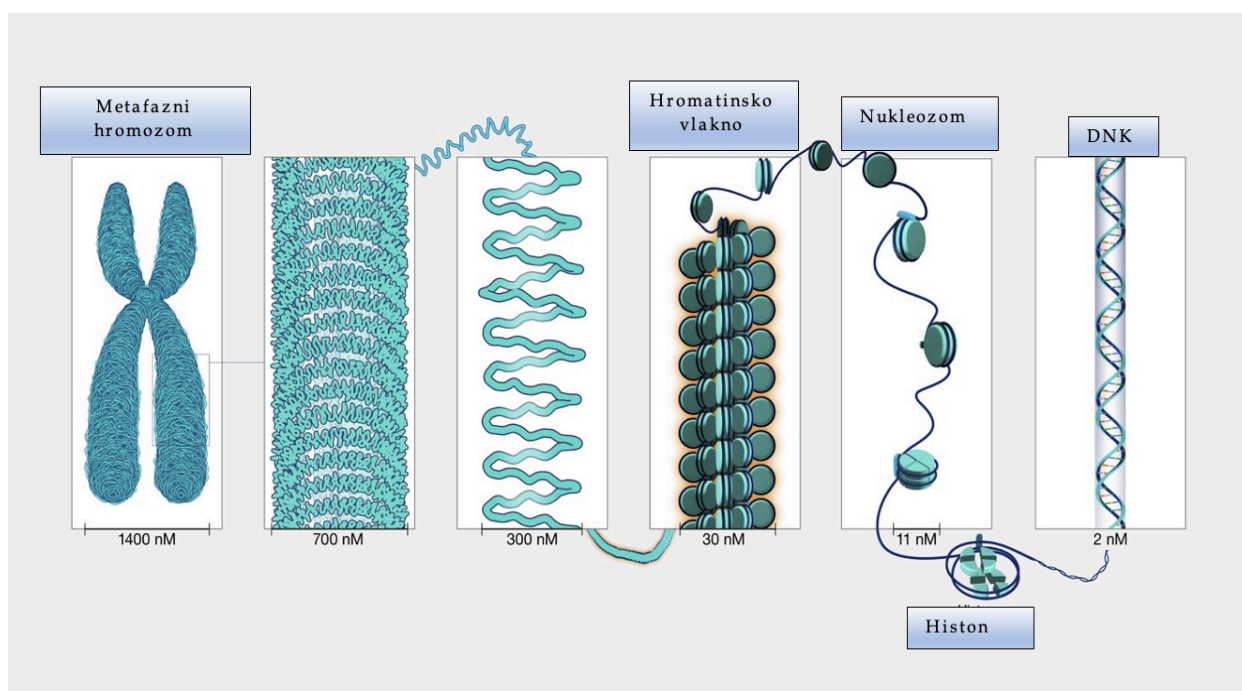
1. UVOD	1
1.1. Definicija i uloga hromatina	2
1.2. Metode za procenu strukturne organizacije hromatina	6
1.3. Mentalni distres.....	10
1.3.1. Pojam mentalnog distresa	10
1.3.2. Komponente mentalnog distresa	11
1.3.2.1. Depresija	11
1.3.2.2. Anksioznost	12
1.3.2.3. Stres	13
1.3.2.4. Emocionalna regulacija	15
1.3.3. Povezanost mentalnog distresa i imunskog sistema	17
1.4. Fizička aktivnost.....	22
1.4.1. Definicija fizičke aktivnosti	22
1.4.2. Opšte uloge fizičke aktivnosti.....	26
1.4.3. Metode za procenu intenziteta fizičke aktivnosti	28
1.4.4. Fizička aktivnost kao modulišući faktor funkcije neutrofila	33
1.4.5. Međusobna povezanost fizičke aktivnosti i mentalnog distresa ...	36
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	38
3. MATERIJAL I METODOLOGIJA	40
3.1. Izbor ispitanika i kriterijumi za podelu na grupe u istraživanju	41
3.2. Protokol prikupljanja podataka	42
3.2.1 Antropometrijska merenja ispitanika	42
3.2.2. Fizikalni pregled ispitanika	43
3.3. Gray Level Co-occurrence Matrix (GLCM) algoritam teksturalne analize.....	43
3.4. Metode za procenu mentalnog distresa.....	47
3.5. Procena intenziteta fizičke aktivnosti	48
3.6. Statistička analiza podataka	50
4. REZULTATI	51
4.1. Demografske karakteristike ispitanika, antropometrijske mere, intenzitet fizičke aktivnosti i rezultati testova za procenu mentalnog distresa	52
4.2. Teksturalni indikatori neutrofilnih granulocita i njihova povezanost sa intenzitetom fizičke aktivnosti i rezultatima mentalnog distresa.....	57
4.3. Model mašinskog učenja zasnovan na algoritmu „slučajnih šuma“ ...	65
4.4. Model mašinskog učenja zasnovan na “Gradient Boosting” regresorskom algoritmu	68

4.5. Model mašinskog učenja zasnovan na "Support Vector Machine" regresorskom algoritmu	70
5. DISKUSIJA	72
6. ZAKLJUČCI	95
7. LITERATURA	98

1. UVOD

1.1. Definicija i uloga hromatina

Hromatin predstavlja složeni kompleks makromolekula koji se nalazi u jedru eukariotskih ćelija, a koji igra ključnu ulogu u regulisanju ekspresije gena i održavanju integriteta genetskog materijala (Zhou and Gaullier, 2019). Struktura hromatina se sastoji od molekula DNK koji su obmotani oko jezgra osam histonskih proteina, formirajući matricu poznatu kao nukleozom (Zhou and Gaullier, 2019). Molekul DNK je negativno naelektrisan, dok su histoni pozitivno naelektrisani. Ova elektrostatička privlačnost između DNK i histona pomaže u stabilizaciji strukture nukleozoma. Višestruki nukleozomi su međusobno povezani delovima DNK linkera da bi se formiralo hromatinsko vlakno. Ovo vlakno se može savijati i uvijati u strukture višeg reda, formirajući na kraju kompaktnu, kondenzovanu strukturu hromozoma (slika 1).

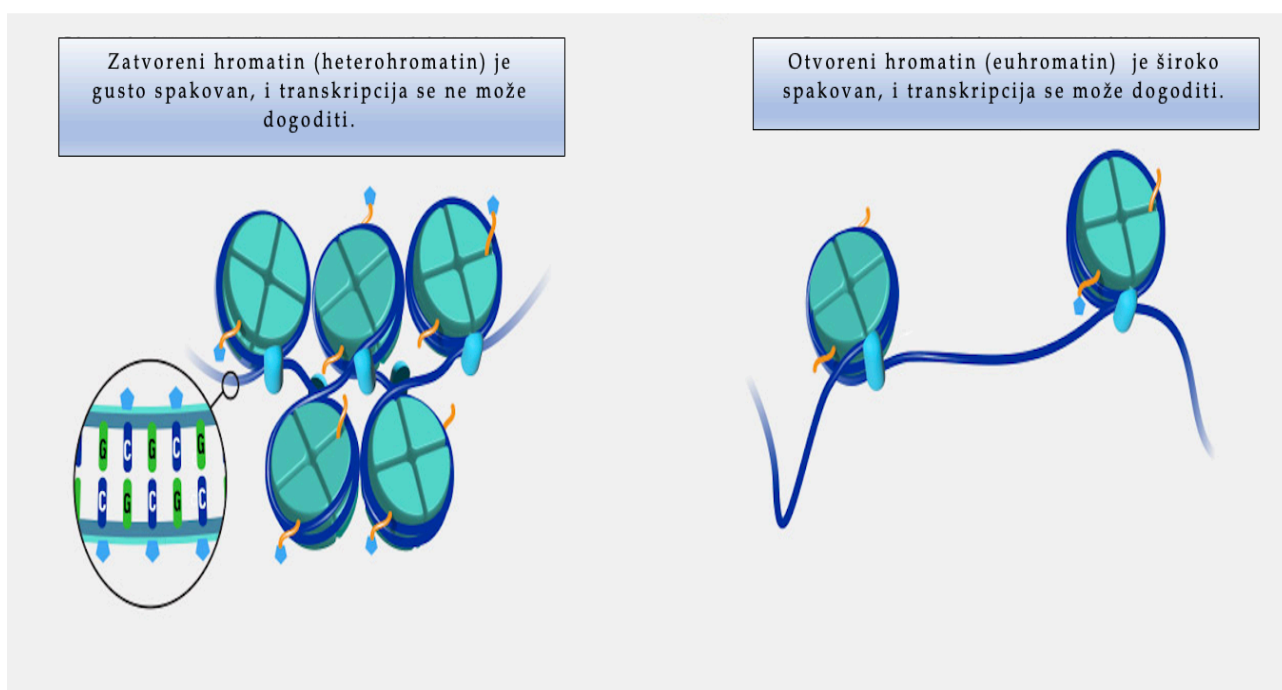


Slika 1. Struktura hromatina - preuzeto i prevedeno sa <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Chromatin>

Nukleozom je osnovna strukturalna jedinica organizacije DNK u eukariotskim ćelijama. Ovakva ponavljajuća organizacija hromatina se pod svetlosnim ili elektronskim mikroskopom vizualizuje poput perli na nitima, gde DNK predstavlja niti, a nukleozomi perle. U nukleozomu, DNK je obmotana oko histonskog jezgra za oko 1,7 okreta, a proteini histona pomažu da se DNK spakuje i organizuje u manji prostor, omogućavajući joj da se uklopi u jezgro eukariotske ćelije. Histoni koji čine jezgro nukleozoma obično su označeni kao H2A, H2B, H3 i H4. Postoje dve kopije svakog od ovih proteina u jezgrou, čineći ukupno osam histonskih proteina. Za razliku od centralno strukturiranih domena histonskih proteina koji čine globularni deo nukleozoma, N-terminalni domen sva četiri histona i C-terminalni domeni H2A i H2B, nazvani "histonski repovi", slabije su strukturirani i vire iz nukleozoma.

Euhromatin i heterohromatin su dva glavna oblika hromatina koji imaju različite strukture i funkcije unutar jezgra (slika 2). Euhromatin se odnosi na manje kondenzovan, transkripciono aktivan oblik hromatina. Karakteriše ga otvorenija struktura, koja omogućava lak pristup DNK transkripcionim faktorima i drugim regulatornim proteinima. Euhromatin se često nalazi u regionima genoma koji se aktivno transkribuju, kao što su geni koji kodiraju proteine. Funkcije euhromatina uključuju ekspresiju gena, replikaciju i reparaciju DNK (Morrison and Thakur, 2021).

Heterohromatin je kondenzovaniji, transkripcijski neaktivan oblik hromatina. Karakteriše ga zatvorenija struktura, koja ograničava pristup DNK regulatornim proteinima. Heterohromatin se često nalazi u regionima genoma koji nisu pod uticajem aktivne transkripcije, kao što su ponavljajuće sekvence DNK i neaktivni X hromozom u ženskim ćelijama. Funkcije heterohromatina uključuju segregaciju hromozoma tokom mitoze i održavanje genomske stabilnosti (Morrison and Thakur, 2021)



Slika 2. Struktura hetero i euhromatina - preuzeto i prevedeno sa <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Chromatin>

Veliki broj naučnih studija su pokušale da dokažu uloge i funkcije euhromatina i heterohromatina. Studija objavljena u časopisu Current Opinion in Biotechnology 2019. godine istraživala je ulogu heterohromatina i euhromatina u održavanju stabilnosti genoma. Istraživači su koristili specijalnu tehnologiju za modifikaciju gena - CRISPR-Cas9 da izmene strukturu gena uključenih u formiranje heterohromatina i euhromatina u humanim ćelijama. Otkrili su da zbog svoje aktivnije forme, kod euhromatina, dolazi do povećanog oštećenja DNK i genomske nestabilnosti u odnosu na heterohromatin (Verkuijl and Rots, 2019).

Međutim, Kalimasioti-Pazi i sar. su dokazali da stanje hromatina može ometati mutagenезu, ali samo do onog stepena koji zavisi od drugih ključnih parametara koji su uključeni u promene. Oni su dokazali da je mutagenезa heterohromatina u poređenju sa euhromatinom bila značajno otežana kada je izlaganje Cas9 tehnologiji bilo kratko i kada je intracelularna ekspresija Cas9 bila niska. Nasuprot tome, na sam ishod mutagenih reparacija DNK nije uticalo stanje hromatina. Njihovi podaci su pokazali da heterohromatin predstavlja propusnu barijeru koja utiče na kinetiku mutacija, ali ne i na krajnju tačku reparacije DNK (Kallimasioti-Pazi et al., 2018). Studija objavljena u časopisu *Epigenetics & Chromatin* 2022. godine istraživala je odnos između euhromatina i heterohromatina tokom razvoja voćne mušice *Drosophila melanogaster*. Istraživači su otkrili da protein nazvan HP1, koji je uključen u formiranje heterohromatina, takođe reguliše formiranje euhromatina tokom razvoja (Schoelz and Riddle, 2022). Ove studije, kao i mnoge druge, pokazuju važnost i usku međusobnu povezanost euhromatina i heterohromatina u različitim ćelijskim procesima, i naglašavaju dinamičku prirodu strukture i funkcije hromatina koja predstavlja važnu determinantu u regulaciji ćelije.

Jedna od primarnih funkcija hromatina je da reguliše ekspresiju gena. Kontrolom dostupnosti DNK faktorima transkripcije i drugim regulatornim proteinima, hromatin može aktivirati ili potisnuti ekspresiju gena kao odgovor na različite ćelijske signale. Pored uloge u ekspresiji gena, hromatin takođe igra ključnu ulogu u održavanju stabilnosti genetskog materijala. Stabilnim povezivanjem molekula DNK u kompaktnu strukturu, hromatin može zaštititi DNK od oštećenja izazvanih faktorima okoline kao što su zračenje ili hemijski toksini (Friedland and Kundrat, 2015; Fischle and Schwarzer, 2016). Naime, dokazano je da hromatin može da popravi oštećenu DNK regrutovanjem specifičnih enzima za popravku oštećenih regiona genoma. Struktura hromatina može se promeniti na različite načine da bi se regulisala ekspresija gena i drugi ćelijski procesi, a ove promene se mogu preneti kroz ćelijsku deobu, a ponekad čak i sa jedne generacije na drugu.

U eukariotskim ćelijama, DNK je umotana u hromatin u jedru. Nukleozom, osnovna jedinica hromatina, sastoji se od 146–147 parova baza DNK i histonskog oktamera sa jednim H2A–H2B tetramerom i dva H3–H4 dimera. Do danas je otkriveno da modifikacije histona igraju jednu od najvažnijih uloga u velikom broju ćelijskih procesa. N- i C-terminalni repovi histonskih proteina mogu biti izloženi post-translacionim modifikacijama (PTM), procesima acetilacija, fosforilacija, metilacija i ubikvitinacija (Zhang et al., 2021). Ove modifikacije, koje se javljaju na dostupnim repovima histona, mogu direktno modulirati interakcije histon-DNK i takođe formirati mesta za spajanje kako bi se olakšalo regrutovanje specifičnih nehistonskih proteina u hromatin. Važno je da kombinacije PTM-a koje se javljaju na istom repu histona (u cis) ili na drugom repu (u trans) obliku, čine „histonski kod“ ili potpis (Rossetto et al., 2012). Ovaj kod se zatim dešifruje pomoću tzv. čitač proteina koji sadrže receptore vezivanja specifične za svaku modifikaciju: na primer, hromodomeni specifično prepoznaju metilirane ostatke, dok bromodomeni vezuju acetilirane ostatke (Rossetto et al., 2012).

Prepoznavanje post-translacionih promena rezultira lokalnim vezivanjem kompleksa koji sadrže čitače poznate kao efektore koji tumače signal, što na kraju dovodi do remodeliranja hromatina. Upravo ove PMT-a imaju najvažniju ulogu u regulaciji strukture hromatina. jer mogu da promene elektronski naboj i strukturu histonskih repova, koji se vezuju za DNK, da bi promenili status hromatina i naknadnu ekspresiju gena (Zhang et al., 2021). Ne samo da modifikacije histona mogu da kontrolišu ekspresiju gena, već takođe mogu da učestvuje u deobi ćelija, ćelijskoj apoptozi i formiranju ćelijske memorije tako što regrutuju proteinske komplekse i utiču na nishodne proteine. Ove promene u strukturi histona takođe mogu imati uticaj na imuni sistem i inflamatornu reakciju (Daskalaki et al., 2018; Roy et al., 2021). Pored toga, mnoge nedavne studije su pokazale da je histonski kod povezan sa cirkadijalnim ritmom i reparacijom DNK, što povećava značaj ovih promena (Navarro et al., 2020; Hergenhan et al., 2020).

Naučna istraživanja su pružila dokaze o važnosti strukture hromatina i histonskih PTM-a u regulisanju ekspresije gena i drugih ćelijskih procesa. Studija objavljena u *Muscle Nerve* časopisu 2015.godine istraživala je ulogu proteina histon deacetilaze (HDAC), koji se kod fiziološke atrofije mišića suprotstavljaju aktivnost histon acetiltransferaza (HATs). Istraživači su otkrili da je acetilacija histona povezana sa eksperimentalnim modelima koji dovode do atrofije (Beharry and Judge, 2015). Druga studija objavljena u *Protein Cell* 2021.godine istraživala je ulogu metilacije histona u regulisanju ekspresije gena uključenih u odluke o diferencijaciji ćelija u embrionu miša u razvoju. Istraživači su otkrili da su specifične histonske metiltransferaze i demetilaze bile uključene u uspostavljanje i održavanje različitih obrazaca metilacije histona u ključnim regulatornim regionima genoma. Takođe su pokazali da poremećaji ovih obrazaca mogu dovesti do abnormalnog razvoja organa i bolesti (Xu et al., 2021). Studija objavljena u časopisu *Cell* 2018. istraživala je ulogu strukture hromatina u regulisanju ekspresije gena uključenih u diferencijaciju imunih ćelija. Istraživači su koristili tehniku pod nazivom ATAC-sek da mapiraju dostupnost regiona hromatina u različitim fazama razvoja imunih ćelija. Otkrili su da je dostupnost hromatina dinamički regulisana tokom diferencijacije i da su promene u pristupačnosti povezane sa promenama u ekspresiji gena. Takođe su identifikovali specifične faktore transkripcije koji su bili uključeni u ovaj proces (Buenrostro et al., 2018). Ovo je samo nekoliko rezultata iz naučnih studija koje su istraživale ulogu strukture hromatina i histonskih PTM-a u regulisanju ekspresije gena i drugih ćelijskih procesa, a koje pružaju snažne dokaze o važnosti epigenetskih mehanizama u kontroli ekspresije gena i održavanju ćelijskog identiteta.

Hromatin je nukleoproteinska struktura koji reguliše ekspresiju gena, a takođe strukturise i organizuje DNK u eukariotskim ćelijama. Da bi se kontrolisala dostupnost DNK, struktura hromatina mora biti dinamički modulirana. Hromatin se može modifikovati kao odgovor na stimulanse iz okoline, kao što je mentalni distres ili fizička aktivnost, da bi se promenila ekspresija gena i prilagodila promenljivim uslovima (Daskalaki et al., 2018; Neuffer et al., 2015).

Struktura hromatina takođe može da se promeni kao odgovor na različite signale tokom embrionalnog razvoja, omogućavajući ćelijama da se diferenciraju u različite tipove sa jedinstvenim profilima ekspresije gena. Ćelijski procesi kao što su transkripcija, replikacija DNK, odgovor na oštećenje DNK i epigenetske modifikacije mogu uticati na strukturu i funkciju hromatina (Karakaidos et al., 2020; Mognato et al., 2021; Alabert et al., 2017). Ove modifikacije uključuju promene u sastavu histonskih proteina, hemijske modifikacije molekula DNK i dodavanje ili uklanjanje različitih nehistskih proteina. Zajedno, ove modifikacije regulišu dostupnost DNK ćeliji u različitim fazama deobe, koja kontroliše ekspresiju gena, omogućavajući ćelijama da odgovore na različite fiziološke i/ili patološke stimuluse.

Hromatin je kritična komponenta eukariotske ćelije koja igra centralnu ulogu u regulisanju ekspresije gena i održavanju integriteta genetskog materijala. Kroz svoje dinamičke modifikacije i strukturnu organizaciju, hromatin omogućava ćelijama da reaguju na promenljive fiziološke potrebe i uticaje životne sredine, obezbeđujući pravilno funkcionisanje i opstanak ćelije. Još uvek nije dokazano da li i na koji način mentalni distres kod populacije sportista u kombinaciji sa različitim nivoom fizičke aktivnosti dovodi do promena strukturne organizacije hromatina neutrofilnih granulocita, a time i do značajnijih epigenetskih promena koje mogu da budu uzrok velikog broja oboljenja.

1.2. Metode za procenu strukturne organizacije hromatina

U savremenoj medicinskoj praksi i medicinskim istraživanjima su u poslednje dve decenije sve više zastupljene moderne i inovativne metode detekcije, analize i praćenja velikog broja kliničkih parametara. Ove metode se zasnivaju na principima informacionih tehnologija, matematičkih analiza, softverske obrade, kao i veštačke inteligencije (Jassar et al., 2022; Telecan et al., 2022; Huss and Coupland, 2020). Izuzetan napredak u tehnologiji digitalnog snimanja napravio je revoluciju u oblasti ćelijske biologije, medicinske histologije, kao i humane i animalne patologije omogućavajući dobijanje slika visoke rezolucije ćelija i tkiva sa većom tačnošću i preciznošću nego ikada ranije. Za analizu medicinskih signala se može koristiti nekoliko različitih metoda, od kojih se u zadnjih nekoliko godina u velikoj meri izdvojila izuzetno značajna metoda teksturalne analize (Hatt et al., 2017). Ova metoda predstavlja optimalnu tehniku za analizu digitalnih mikrofotografija, koja uključuje upotrebu matematičkih i kompjuterskih algoritama za kvantifikaciju promena u strukturi i distribuciji ćelijskih komponenti. U slučaju ćelijskih jezgara, teksturalna analiza se može koristiti za kvantifikaciju promena u distribuciji nuklearnog hromatina koje nastaju kao posledica dejstva različitih hemijskih supstanci i biološki aktivnih jedinjenja (Paunovic et al., 2021; Nikolovski et al., 2019). Takođe, promene nastale na hromatinu mogu ukazivati na različita patološka stanja kao što su mnogobrojne vrste tumora (dojke, kolona, osteosarkomi), autoimune i druge sistemske bolesti (Gupta et al., 2020; Zhao et al., 2021; Surace and Hedrich, 2019).

Simultana upotreba metoda mašinskog učenja i veštačke inteligencije (*engl. Artificial Intelligence-AI*), kombinovano sa metodama teksturalne analize poseduje ogroman potencijal koji u budućnosti može dodatno automatizovati i poboljšati tačnost ovih tehnika, a takođe, ove tehnike imaju ogromnu mogućnost da ubrzaju tempo naučnih otkrića, poboljšaju kvalitet dijagnostike, lečenja i praćenja pacijenata.

Teksturalna analiza podrazumeva specifičan niz savremenih matematičkih proračuna čiji je osnovni cilj da adekvatno kvantifikuju dvodimenzionalne zapise teksturalnih obrazaca, kao što su mikrografi ili rentgen zapisi, tj. da proceni strukturu samog dvodimenzionalnog objekta (Di Cataldo and Ficarra, 2016). Prednost teksturalne analize se pre svega ogleda u tome da je senzitivnost same metode izrazito visoka, pa se na ovaj način mogu sa velikom tačnošću kvantifikovati i uočiti promene u zapisima koje su izuzetno diskretne ili čak potpuno neprimetne za oko čoveka. Zbog velike preciznosti, teksturalna analiza je postala sastavni deo naučnoistraživačkog rada u velikom broju medicinskih oblasti, pre svega u celularnoj medicini, zatim radiološkoj dijagnostici, histologiji, patologiji, onkologiji, dermatologiji i neuronaukama (Wang et al., 2022; Cavallo et al., 2021; Zahedi et al., 2018; Bernardis et al., 2021; Nagawa et al., 2021). U literaturi je opisano nekoliko metoda koje se mogu upotrebiti kako bi se adekvatno i sigurno sproveda sama procedura teksturalne analize mikrografa (Di Cataldo and Ficarra, 2016). Ove metode se vrlo često oslanjaju na vrlo kompleksne i zahtevne matematičke proračune i algoritme, uključujući istovremenu primenu statistike drugog reda na vrednosti rezolucioničkih jedinica.

Teksturalna analiza upotrebom takozvane metode „matrice ko-pojavljivanja sivih vrednosti rezolucioničkih jedinica“ (*engl. Gray Level Co-occurrence Matrix - GLCM*) je do sada sa velikim uspehom primenjena u medicini i medicinskim istraživanjima. Ova metoda je od izuzetnog značaja za kvantifikaciju strukturnih promena u ćelijama i njihovim organelama u fiziološkim i patološkim uslovima (Kono et al., 2018; Fekri-Ershad, 2019, Pantic et al., 2016). GLCM kao metoda teksturalne analize je prvi put predstavljena u radu „Textural Features for Image Classification“ autora T. Haralicka, K. Shanmugama i I. Dinstein, objavljenog u časopisu IEEE Transaction Systems Man Cybernetics 1973. godine (Haralick et al., 1973). U ovom radu, Haralick i saradnici su po prvi put upotrebili algoritam ko-pojave sivih vrednosti rezolucioničkih jedinica kako bi izvršili topografsku analizu satelitskih snimaka različitih građevinskih kompleksa i geografskih područja. Poslednjih 20 godina GLCM metoda je pronašla svoju veliku primenu u medicinskim istraživanjima.

GLCM teksturalna analiza je metoda koja se koristi u medicinskoj analizi slike za kvantifikaciju prostornog odnosa između intenziteta rezolucioničkih jedinica na slici, što može pružiti informacije o teksturi slike (Dhruv et al., 2019). U GLCM analizi tekture, matrica ko-pojavljivanja sivih vrednosti se kreira izračunavanjem frekvencije parova piksela sa specifičnim vrednostima nivoa sive boje i prostornim odnosima sive boje na slici. Ova matrica ko-pojavljivanja se zatim koristi za izračunavanje skupa statističkih

parametara koji opisuju svojstva teksture slike pomoću statistike drugog reda, gde se umesto pojedinačnih vrednosti u analizi sirovih podataka uzimaju u obzir parovi vrednosti koji čine odgovarajuću matematičku matricu koja sumira relativnu distribuciju frekvencija (opisuje koliko često će se jedan sivi ton pojavljivati u određenom prostornom odnosu prema drugom sivom tonu na slici) (Carstensen, 1992). Ova metoda se naziva i matrica ko-pojavljivanja ili distribucija ko-pojavljivanja sličnih parova sive boje. GLCM primenjuje složeni matematički algoritam na parove vrednosti sive boje dodeljenih jedinicama rezolucije unutar digitalnog mikrografa, na taj način što izračunava učestalost pojavljivanja parova intenziteta piksela na određenoj udaljenosti i pravcu na slici (Zaletel et al., 2016). Iz GLCM-a se mogu izračunati različite statističke vrednosti, uključujući angularni drugi momenat (indikator teksturalne uniformnosti), inverzni momenat razlike (indikator teksturalne homogenosti), GLCM kontrast, teksturalna korelacija i GLCM varijansa. Ove mere se zatim koriste za karakterizaciju teksture slike, što se u prethodnim istraživanjima pokazalo korisno u velikom broju medicinskih oblasti, ne samo u karakterizaciju mikrostrukture ćelije i ćelijskih komponenti uključujući i hromatin, već i za otkrivanje i klasifikacija tumora, dijagnozu promena na koži, mišićima kao i drugim tkivima (Baidya et al., 2021; Li et al., 2012; Ou et al., 2014; Tang et al., 2022). Svaka od ovih vrednosti nam daje različite vrste informacija o strukturi i organizaciji analizirane slike.

Angularni drugi momenat (engl. *Angular Second Moment-ASM*): Angularni drugi momenat meri distribuciju nivoa sive na slici i pokazatelj je teksturalne uniformnosti slike tako što izračunava distribuciju istovremenih vrednosti piksela na datoj udaljenosti i pod datim uglom. Visoka vrednost ASM ukazuje na uniformniju teksturu.

Inverzni momenat razlike (engl. *Inverse Difference Moment-IDM*): Ova mera je pokazatelj lokalne homogenosti teksture. Izračunava se sabiranjem inverznih kvadrata razlika između vrednosti nivoa sivog susednih piksela, pomnoženim sa odgovarajućim elementom matrice ko-pojavljivanja na nivou sivog.

GLCM kontrast (engl. *Contrast-CON*): Kontrast je važna karakteristika u analizi teksture hromatina. On predstavlja statističku analizu na osnovu koje se opisuje mera varijacije u intenzitetu sivog nivoa između susednih parova piksela na slici. Drugim rečima, kontrast je mera koliko se vrednosti intenziteta sive boje razlikuju između susednih piksela na slici. Izračunava se na osnovu matrice ko-pojavljivanja, koja je histogram učestalosti pojavljivanja parova vrednosti piksela u određenom prostornom odnosu (tj. rastojanju i pravcu) na slici.

Teksturalna korelacija (engl. *Corelation-COR*): Ova mera ukazuje na stepen korelacije između susednih piksela i izračunava se kao kovarijansa između parova sivog nivoa u GLCM-u. Visoka vrednost teksturalne korelacije ukazuje da susedni pikseli imaju slične vrednosti nivoa sive, što implicira homogeniju teksturu. S druge strane, niska vrednost teksturalne korelacije

ukazuje na to da susedni pikseli imaju različite vrednosti nivoa sive, što implicira heterogeniju teksturu.

GLCM varijansa (engl. *Variance-Var*): Ova mera predstavlja varijaciju GLCM-a i izračunava se kao varijansa parova sivog nivoa u matrici. To je pokazatelj složenosti teksture. Parametar varijanse može da pruži informacije o nivou složenosti teksture i stepenu varijacije teksture na slici. Veća vrednost varijanse ukazuje na veću varijabilnost u matrici pojavljivanja na nivou sivog, što sugeriše složeniju teksturu. Niža vrednost varijanse sugeriše manju varijabilnost u matrici, što implicira homogeniju teksturu.

Angularni drugi moment kao indirektni indikator uniformnosti teksture i moment inverzne razlike kao mera teksturalne homogenosti predstavljaju jedne od najvažnijih parametara dobijeni pomoću GLCM-a teksturalne analize. U do sada publikovanim naučnim studijama, ova dva parametra GLCM teksturalne analize su demonstrirala izuzetnu senzitivnost za detektovanje devijacija u strukturi hromatina koje nastaju pod uticajem maligne transformacije same ćelije, na taj način što su sa izuzetnom preciznošću kvantifikovali teksturalnu uniformnost i homogenost, a takođe su korišćeni kao parametri za otkrivanje morfoloških karakteristika koje nastaju u jedru nakon delovanja unutrašnjih ili spoljašnjih činilaca (Gupta et al., 2020; Yang et al., 2022; Nikolovski et al., 2019; Davidovic et al., 2019).

Takođe, GLCM parametri poput teksturalne varijanse hromatinske distribucije se mogu upotrebiti za razlikovanje pojedinih subkortikalnih struktura u mozgu, što je pokazano u studiji gde je ovaj parametar pokazao izuzetnu senzitivnost pri otkrivanju diskretnih razlika između dva morfološki slična regiona hipokampusa (Pantic et al., 2015). Metoda GLCM je takođe sa uspehom primenjena u cilju razvoja biosenzora za detekciju hromatinskog oštećenja limfocita periferne krvi izazvanih određenim neurotoksinima. U ovoj studiji su autori dokazali da se rezultati koji su dobijeni mogu uspešno koristiti u detekciji i evaluaciji diskretnih ranih apoptotičkih strukturnih promena u hromatinu limfocita periferne krvi koje se ne mogu detektovati korišćenjem konvencionalnih tehnika mikroskopije/ćelijske biologije (Zahedi et al., 2018). U ranijim istraživanjima, ova tehnika teksturalne analize je više puta korišćena za procenu strukturnih promena u nuklearnom hromatinu, tokom procesa starenja i programirane ćelijske smrti (Nikolovski et al., 2019; Davidovic et al., 2019). Konačno, prethodna istraživanja su pokazala da kod pacijenata sa rekurentnim depresivnim poremećajem, hromatinski parametri teksture neutrofilnih granulocita krvi mogu biti povezani sa nivoima mentalnog distresa (Pantic et al., 2019). U ovoj studiji, GLCM parametri neutrofilnog hromatina, kao što su ASM i IDM, bili su snažno povezani sa opserviranim nivoom mentalnog distresa. Psihotični fenomeni u depresiji su bili udruženi sa promenama u GLCM varijansi hromatina ovih ćelija. Studija je dokazala da GLCM metoda, kada se primeni na ćelije periferne krvi, ima određenu dijagnostičku i prognostičku vrednost vezano za rekurentni depresivni poremećaj i mentalni distres koji je asociran sa njim. Ovi i drugi nalazi su podvukli potencijalni značaj GLCM analize imunih ćelija za procenu različitih neuroloških i

psihijatrijskih stanja, što smo mi uzeli kao jednu od osnova za opravdanost našeg istraživanja.

U dosadašnjim publikovanim naučnim studijama nije analizirano da li i u kojoj meri se GLCM analiza hromatina neutrofilnih granulocita može koristiti u predikciji mentalnog distresa u različitim populacionim grupama, poput sportista. Takođe je nejasno da li u fiziološkim uslovima, između pojedinih parametara hromatinske organizacije neutrofila i mentalnog distresa postoji statistički značajna korelacija, i da li intenzitet fizičke aktivnosti utiče na takvu korelaciju. Konačno, nepoznato je da li se povezanost parametara GLCM analize i mentalnog distresa može iskoristiti za stvaranje modela mašinskog učenja zasnovanih na veštačkoj inteligenciji, koji bi imali vrednost u određivanju nivoa psihološkog stresa kod zdravih osoba.

1.3. Mentalni distres

1.3.1. Pojam mentalnog distresa

Prema definiciji iz 2015. godine mentalno zdravlje je dinamičko stanje unutrašnje ravnoteže koje omogućava pojedincima da koriste svoje sposobnosti u skladu sa univerzalnim vrednostima društva (Galderisi et al., 2015). Osnovne kognitivne i socijalne veštine, sposobnost prepoznavanja, ispoljavanja i modulacije sopstvenih emocija, kao i empatije sa drugima, fleksibilnost i sposobnost suočavanja sa nepovoljnim životnim događajima i funkcionisanje u društvenim ulogama, kao i harmoničan odnos između tela i uma predstavljaju važne komponente mentalnog zdravlja koje doprinose, u različitom stepenu, stanju unutrašnje ravnoteže (Galderisi et al., 2015). Unutrašnja ravnoteža se smatra „dinamičkim stanjem“ i odražava činjenicu da različite životne epohe (adolescencija, roditeljstvo, odlazak u penziju) utiču na postignutu ravnotežu i mogu zahtevati prilagođavanje.

Termin distres se često koristi u medicinskoj literaturi da opiše nelagodnost pacijenta u vezi sa znacima i simptomima akutne ili hronične bolesti, anksioznosti pre ili posle tretmana ili narušenog statusa fetusa ili respiratornog sistema. Pojam mentalni distres opisuje emocije koje ometaju ili narušavaju sposobnost pojedinca da se nosi sa regularnim životnim okolnostima (Brijnath et al., 2023). Mentalni distres je zbog toga sveobuhvatan termin koji se koristi za opisivanje niza mentalnih i emocionalnih simptoma. Može se manifestovati kao osećaj razdražljivosti, beznađa, krivice, tuge, srama, anksioznosti, straha, besa ili bezvrednosti. Mentalni distres takođe može izazvati fizičke simptome kao što su glavobolja, umor, poremećaji spavanja, promene u apetitu i bolovi u telu. Mentalni distres može biti fiziološki odgovor na stresore ili životne događaje, kao što je smrt voljene osobe, gubitak posla ili problemi u emotivnoj vezi. Međutim, kada ovi simptomi potraju ili postanu ozbiljni, oni mogu ukazivati na poremećaj mentalnog zdravlja od kojih su najvažniji i najčešći depresija, anksioznost, hronični stres, poremećaj kontrole emocija, pa sve do veoma teških poremećaja, kao što je šizofrenija (Cree et al., 2020).

Institut za evaluaciju i merenje zdravlja je objavio podatke da je globalna incidenca mentalnog distresa u 2019. godini iznosila 12.5% (Institute of Health Metrics and Evaluation, 2022). Ta stopa se značajno povećala u toku 2020. i 2021. godine zbog pandemije korona virusa.

Mentalni distres može izazvati tešku invalidnost. Pored svojih primarnih efekata, ovaj poremećaj takođe uzrokuje sekundarnu invalidnost, pošto pacijenti sa mentalnim distresom imaju veću verovatnoću da razviju hronične sistemske bolesti, a takođe, ovi pacijenti se ređe pridržavaju medicinskog tretmana. Kombinacija primarnog invaliditeta uzrokovanog mentalnim distresom i sekundarnog invaliditeta izazvanog hroničnim sistemskim bolestima čini mentalni distres sa ekonomskog aspekta jednim od najskupljih medicinskih stanja na svetu (World Health Organisation, 2016).

1.3.2. Komponente mentalnog distresa

1.3.2.1. Depresija

Depresija predstavlja jedan od najčešćih i najizraženijih psihijatrijskih poremećaja. Godišnja prevalencija depresije značajno varira od zemlje do zemlje jer društveni i kulturni faktori, kao i socioekonomski status značajno utiču na pojavu depresije, ali se procenjuje na oko 6% (World Health Organisation, 2017). Rizik od depresije u toku celokupnog života je tri puta veći (15–18%), što znači da postoji skoro jedan u pet ljudi koji su doživeli jednu epizodu depresije u nekom trenutku svog života (Mofitt, 2010). Tokom životnog veka, depresija je dvostruko češća kod žena nego kod muškaraca i, kod oba pola, vrhunac prevalencije se javlja u drugoj i trećoj deceniji života, sa naknadnim, ređim vrhuncem, u petoj i šestoj deceniji. Razlika u prevalenciji depresije između muškaraca i žena se naziva rodni jaz u depresiji i smatra se da je povezana sa polnim razlikama u podložnosti faktorima bolesti, kako psihološkim tako i biološkim, a takođe većoj ekspoziciji žena negativnim faktorima životne sredine koji deluju i na mikro i na makronivou (Kuehner, 2017). Depresija se odlikuje poremećajima u spoznaji, emocionalnoj regulaciji, pamćenju, motoričkoj funkciji, motivaciji i neurovegetativnim simptomima (Rahim and Rashid, 2017). Simptomi depresije mogu se široko grupisati u emocionalne, neurovegetativne i kognitivne simptome, ali pošto se često javljaju i kod drugih psihijatrijskih poremećaja i medicinskih stanja, otkrivanje depresivnog sindroma može biti teško. Neki simptomi su specifičniji za depresiju, kao što je anhedonija (smanjena sposobnost doživljavanja zadovoljstva), zatim dnevne varijacije simptoma, tj. simptomi depresije su izraženiji tokom određenih perioda budnosti, kao i pojačano osećanje krivice zbog bolesti. Drugi simptomi, kao što su neurovegetativni simptomi, uključujući umor, gubitak apetita ili težine i nesanicu, veoma su česti kod drugih medicinskih bolesti, pa oni nisu usko vezani za pojavu depresije (Malhi and Mann, 2018). Da bi se postavila dijagnoza depresije, pojedinac mora imati pet ili više određenih simptoma skoro svaki dan tokom perioda od 2 nedelje, a simptomi se moraju jasno razlikovati od prethodnog opšteg funkcionisanja pojedinca (Malhi et al., 2015). Za definitivnu dijagnozu

depresivne epizode mora biti prisutno depresivno raspoloženje ili anhedonija (American Psychiatric Association, 2013). Kada su simptomi depresije prisutni, ali su nedovoljni po broju ili ozbiljnosti da bi se smatrali sindromom, ponekad se nazivaju simptomima depresije ispod praga. Registrovanje ovih simptoma je važno jer oni mogu poslužiti kao rani pokazatelji velike depresivne epizode.

Depresija predstavlja jednu od najčešćih i najvažnijih komponenti mentalnog distresa. Uprkos ogromnom napretku istraživanja u oblasti neuronauka u poslednjih nekoliko decenija, patofiziologija depresije nije u potpunosti razjašnjena. Dosadašnja istraživanja su proučavala nekoliko mehanizama nastanka depresije uključujući izmenjene serotonergičke, noradrenergičke, dopaminergičke i glutamatergične sisteme, povećanu inflamaciju, abnormalnosti hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne osovine, vaskularne promene, kao i smanjenu neurogeneza i neuroplastičnost (Dean and Keshavan, 2017). I ako se različiti biološki mehanizmi uključeni u depresiju mogu činiti nepovezanim, što ukazuje na to da depresija može predstavljati nekoliko biološki diskretnih bolesti, istraživanja su pokazala da su svi ovi putevi međusobno povezani. Za naše istraživanje, posebno su bile interesantne teorije koje povezuju depresiju sa inflamacijom, kao i teorija o međusobnoj konekciji depresije i abnormalnosti hipotalamus-hipofiza-nadbubrežne osovine, zbog udruženog uticaja stresa i endokrinog sistema na pojavu depresivnih simptoma.

1.3.2.2. Anksioznost

Anksioznost je po učestalosti na drugom mestu od svih psihijatrijskih poremećaja u opštoj populaciji, odmah posle depresije. U opštoj populaciji, na godišnjem nivou, stepen prevalencije anksioznosti je do 12,1% (World Health Organisation, 2016). Ipak, prava prevalencija nije poznata jer veliki broj osoba ne traže stručnu pomoć zbog straha od stigmatisanja ili lekari ne uspevaju da postave dijagnozu. Anksiozni poremećaji se češće javljaju kod žena nego kod muškaraca sa približnim odnosom 2:1 (Bangasser and Cuarenta, 2021).

Anksioznost se definiše kao emocija koju determiniše osećaj brige i nelagodnosti, stanje unutrašnjeg nemira i uključuje osećanje straha koji je povezan sa pripremom za očekivane događaje ili okolnosti koje se doživljavaju kao preteće (Lahousen and Kapfhammer, 2018). Anksioznost je usko povezana sa strahom, ali se značajno razlikuje od njega. Dok se anksioznost definiše kao iščekivanje buduće pretnje, strah predstavlja realni emocionalni odgovor na stvarnu pretnju (Locke et al., 2015). Anksioznost je karakteristična po specifičnom obrascu ponašanja koji pored nerealnog straha uključuje zastrašujuće misli, nemir, lošu koncentraciju, sužavanje pažnje, konfuziju, somatske tegobe poput tahikardije, palpitacija, znojenja, mučnine, vrtoglavice, dijareje, mišićne napetosti, nesvestice, kratkog daha, tahipneju. Mehanizam nastanka ovih simptoma se sastoji od složenog kognitivnog, bihevioralnog, fiziološkog i afektivnog sistema odgovora koji je povezan sa pripremom za očekivane događaje ili okolnosti koje se doživljavaju kao

preteće (Chand and Marwaha, 2022). Emocija anksioznosti može trajati izvan fizioloških vremenskih perioda kao odgovor na specifične događaje, i tako se pretvoriti u jedan od višestrukih anksioznih poremećaja. U literaturi se češće koristi termin „anksiozni poremećaji“. Anksiozni poremećaji karakterišu se prolongiranim preteranim strahom i uznemirenošću, i povezani su sa poremećajima u ponašanju (Park and Kim, 2020). Simptomi su dovoljno izraženi da dovedu do značajnog stresa ili značajnog oštećenja funkcionisanja. Literatura opisuje nekoliko različitih vrsta anksioznih poremećaja, kao što su: generalizovani anksiozni poremećaj koji se karakteriše preteranom brigom, socijalni anksiozni poremećaj koji se odlikuje preteranim strahom i brigom u određenim društvenim situacijama, panični poremećaj čija su glavna odlika napadi panike, kao i tkz. poremećaj anksioznosti separacije koji predstavlja poremećaj u vidu preteranog straha ili emociju anksioznosti zbog odvajanja od osoba sa kojima postoji duboka emocionalna veza (Park and Kim, 2020). Razlika između anksioznog poremećaja kao mentalnog poremećaja i anksioznosti kao normalne emocije je u tome što ljudi sa anksioznim poremećajima doživljavaju anksioznost većinu dana tokom otprilike 6 meseci. Anksiozni poremećaji su među najdugotrajnijim mentalnim problemima i često traju decenijama (American Psychiatric Association, 2013).

1.3.2.3. Stres

Tvorac koncepta stresa je bio američki fiziolog, otac teorije homeostaze i termina „bori se ili beži odgovora“, Walter Bradford Cannon koji je 1935. godine stres definisao kao pretnju homeostazi (Cannon, 1935). Jedna od najcitiranijih definicija stresa je rezultat istraživanja mađarsko-kanadskog endokrinologa Hansa Selye koji je nazvao stres „sindromom opšte adaptacije“ (Selye, 1936). Hans Selye se smatra osnivačem modernog istraživanja stresa. Selye je izneo dve važne pretpostavke: 1. stres je u osnovi fiziološki odgovor i 2. stres je nespecifičan odgovor tela na bilo koju potrebu ili pretnju sa kojom se susreće (Selye, 1975).

Koncept stresa se od tada do danas značajno proširio i evaluirao. Stres se u modernoj literaturi definiše kao stanje homeostaze koja se narušava, uključujući i sistemski i lokalni stres (Rom and Reznick, 2016). Specifični stresor može potencijalno da izazove specifičan lokalni stres, dok intenzitet stresa iznad praga dovodi do aktiviranja osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (HHN) i rezultira sistematskim odgovorom na stres. Takođe, stres ne uključuje više samo negativne aspekte kao što su „sindrom opšte adaptacije“, pretnje po zdravlje i život, već i pozitivne aspekte kao što su prilagođavanje postojećim stresorima i adaptacija na njih.

Danas se pojam stresa više ne odnosi samo na akutnu aktivaciju HHN osovine i niza kompenzatornih odgovora simpatičnog autonomnog nervnog sistema i nadbubrežnih žlezda kada je homeostaza ugrožena, kako su Selye i Cannon opisivali. Preciziranjem pojma homeostaze, koncept stresa postaje sve specifičniji. Kao primere, možemo uzeti oksidativni stres koji se posebno odnosi na poremećaj redoks signalizacije i kontrole, a stres endoplazmatskog

retikuluma se odnosi na stres izazvan akumulacijom nesavijenih proteina u endoplazmatskom retikulumu (Walter and Ron, 2011; Sies, 2015). Dokazano je da i niži organizmi ili izolovana tkiva i ćelije takođe imaju odgovor na stres (Bailey, 2016; Guo and Henley, 2014).

Bitno je istaći da model sistema stresa sadrži pet osnovnih elemenata: stresni stimulus, stresor, stres, odgovor na stres i efekat stresa (Goldstein, 2021). U ovom okviru, stresni stimulus je početna tačka, efekat je krajnja tačka, a stresor, stres i odgovor na stres su kaskade. Na osnovu ovog modela, može se definisati svaki element sistema stresa. Stresori su faktori sa potencijalom da direktno izazovu poremećaje homeostaze. Stres je stanje homeostaze koje se dovodi u pitanje. Stresni stimulansi su agensi koji mogu inicirati stvaranje stresora. Odgovor na stres je kompenzacioni mehanizam koji ima za cilj ponovno postizanje homeostaze. Efekti stresa su biološke posledice koje nastaju kao rezultat borbe sa stresorima, a podrazumeva ponovno uspostavljanje homeostaze koja promovira zdravlje (pozitivni efekti), ili izazivanje oštećenja organizma ili čak bolesti (negativni efekti) (Lu et al., 2021).

Dve glavne kategorije stresa su: fiziološki i psihološki stres (Mason, 1975). Dok se psihološki stres odnosi samo na sistemski stres koji ima najveći uticaj na osovину hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda, fiziološki stres ima i sistemski i lokalni uticaj. Sistemski uticaj je sličan uticaju psihološkog stresa, dok se specifičnost lokalnog stresa ogleda u mestima na kojima se stresori stvaraju, pa samim tim možemo imati stres citoskeleta, stres endoplazmatskog retikuluma, stres telomera, mitohondrija (Doss et al., 2020; Da Silveira et al., 2020; Chen and Cubillos-Ruiz, 2020; Mendere et al., 2020) ili prema funkcijama (metabolički stres, neurodegenerativni stres) (Lampert et al., 2020; Cooper et al., 2020).

Mnogobrojni istraživači koncepte stresa i dalje usko povezuju sa negativnim efektima po zdravlje, iako postoje mnogobrojni naučni dokazi da stresori uglavnom pokazuju dvofazni dozno-zavisni efekat. Dvofazni koncept propagira teoriju da bi izloženost stresorima na visokom nivou mogla biti štetna po zdravlje, dok niska izloženost stresorima ima pozitivne efekte po zdravlje (Calabrese and Mattson, 2017). Ovi dvofazni dozno-zavisni odgovori su definisani kao „hormeza“, a adaptivni odgovor na niske doze se smatra rezultatom kompenzacionih bioloških procesa za obnavljanje homeostaze poremećene stresorima (Li and He, 2009). U ovom kontekstu, stres se mora podeliti na eustres i distres. Eustres označava fiziološki povoljan stres, odnosno homeostaza je minimalno poremećena umerenim nivoima stresora. Eustres izaziva optimalnu reakciju na stres, poboljša puferski kapacitet homeostaze i koristi zdravlju. Distres podrazumeva nepovoljan nivo stresa, gde dolazi do intenzivne promene homeostatskih parametara koji uvek dovode do pojačanog sistemskog ili lokalnog odgovora na stres, koji posledično narušava homeostazu i ugrožava zdravlje (Bienertova-Vasku et al., 2020).

Stres je stanje homeostaze koja se dovodi u dizbalans. Jasno je da se stres može desiti sistemski kroz aktiviranje HHN osovine (sistemski stres) ili može da se desi samo na mestu gde su stresori indukovani ili generisani (lokalni stres). Stresori mogu pokrenuti odgovore na molekularnom, ćelijskom i sistemskom nivou kako bi se očuvala homeostaza i izazvala adaptacija. Stres može imati značajan uticaj na imuni sistem, kroz složene interakcija između nervnog i imunološkog sistema. Hormoni stresa poput kortizola, norepinefrina i adrenalina imaju značajan uticaj na imuni sistem (Zefferino et al., 2021). Hronični stres osim inflamacije, može potisnuti proizvodnju citokina, proteina koji igraju ključnu ulogu u imunološkoj funkciji. Studije koje povezuju stres i imuni sistem su dokazale da je reakcija na stres različita kod različitih pojedinaca, i zbog toga je od izuzetne važnosti utvrditi na koji način populacija sportista reaguje na stres, i do kakvih promena u imunskom sistemu to može dovesti.

1.3.2.4. Emocionalna regulacija

Emocionalna regulacija privlači značajnu i sve veću pažnju u poslednjih nekoliko decenija u psihijatriji, neurologiji, psihologiji i srodnim oblastima. Opsežno je ispitivana u literaturi, pre svega zbog svojih izuzetno važnih ishoda na psihičko i fizičko zdravlje. Obimno istraživanje koje je ispitalo osnove emocionalne regulacije u smislu bioloških, društvenih, razvojnih, kognitivnih i procesa razvoja ličnosti, kao i njihovih povezanosti sa fizičkim i psihičkim zdravljem i njihovom disfunkcijom je opisano u drugom izdanju priručnika za emocionalnu regulaciju (Gross, 2014). Oblast kliničke psihijatrije jasno naglašava da je loša emocionalna regulacija bitan transdijagnostički faktor rizika koji je uključen u mnoge psihijatrijske poremećaje, uključujući mentalni distres koji obuhvata anksioznost, depresiju i stres, zatim poremećaje raspoloženja, ličnosti, kao i poremećaje u ishrani (Cludius et al., 2020). Emocionalna regulacija je definisana kao „proces kojim pojedinci utiču na to koje emocije imaju, kada ih imaju i kako ih doživljavaju, a strategije regulacije emocija mogu biti automatske ili kontrolisane, svesne ili nesvesne, i mogu imati svoje efekte u jednoj tački ili više tačaka u procesu generisanja emocija” (Eisma and Stroebe, 2021). Emocionalna regulacija započinje kada je cilj regulacije da se doživi drugačija emocija, aktiviran neskladom između generisane emocije i nekog željenog emocionalnog stanja.

Uprkos mnogim oblicima koje emocionalna regulacija može imati, postoje tri važna zajednička faktora za emocionalnu regulaciju – svest, ciljevi i strategije. Svest o emocijama, kao i kontekstu u kome se one javljaju, moćna je alat za emocionalnu regulaciju. Emocionalna svest poboljšava i opseg dostupnih strategija za emocionalnu regulaciju i fleksibilnost sa kojom ih neko koristi. Drugi važan faktor u emocionalnoj regulaciji je cilj regulacije emocija – to jest, ono što se želi postići. Ciljevi emocionalne regulacije uključuju povećanje ili smanjenje veličine ili intenziteta doživljaja emocija, kao i modifikovanje ispoljavanja emocija. Treći faktor koji je važan za emocionalnu regulaciju su specifične strategije koje se sprovode da bi se postigla regulacija emocija. Dok ciljevi regulacije emocija određuju krajnji efekat i obrazac ponašanja, strategije regulacije emocija specificiraju načine

na koje se emocionalna regulacija sprovodi (Bonanno and Burton, 2013). Upotreba specifične strategije emocionalne regulacije u određenoj situaciji može zavisiti od više faktora, uključujući kontekst u kojem se primenjuje i fleksibilnost sa kojom se mogu primeniti strategije emocionalne regulacije na različite tipove stresora (nazvanih oscilacija).

Strategije koje koristimo za emocionalnu regulaciju mogu da menjaju emocionalni odgovor pre nego što je u potpunosti generisan (npr. preispitivanje značenja situacije u kojoj je emocija generisana), dok druge moduliraju već generisani emocionalni odgovor (npr. suzbijanje emocija - ekspresivno ponašanje). Sada je jasno da različite strategije regulacije emocija imaju sasvim različite posledice, pri čemu su neke strategije generalno adaptivne (kao što je kognitivna preformulacija), a druge strategije su generalno neprilagođene (kao što je emocionalna supresija) (Sikka et al., 2022). Upravo su strategija kognitivne preformulacije i strategija emocionalne supresije dve najpoznatije strategije za emocionalnu regulaciju.

Strategije kognitivne preformulacije uključuju modifikaciju načina na koji se razmišlja o stimulansu koji izaziva emocije, tako da se emocionalni odgovor koji on izaziva menja u željenom pravcu (Thompson et al., 2019). Strategija kognitivne preformulacije se najčešće definiše kroz ponovnu procenu, koja se često operacionalizuje ili kao semantička ponovna procena ili kao ponovna procena putem promene perspektive (Ochsner et al., 2012). Semantičko preispitivanje se odnosi na kognitivno-lingvističku strategiju u kojoj se menja značenje vezano za emocionalni stimulus (Naragon-Gainey et al., 2017). Ponovna procena kroz promenu perspektive podrazumeva usvajanje perspektive odvojenog posmatrača kako bi se kognitivno distancirao od emocionalnog stimulusa/stanja, a da se pritom ne menja njegovo značenje (Ochsner et al., 2012). Pokazalo se da ponovna procena regrutuje mrežu regiona mozga povezanih sa kognitivnom kontrolom, pažnjom i verbalnom obradom, uključujući prednji cingularni korteks i dorsolateralni prefrontalni korteks. Analize funkcionalne povezanosti su pokazale da je aktivnost u ovim regionima mozga obrnuto povezana sa aktivacijom amigdale, što najverovatnije odražava smanjen emocionalni odgovor nakon regulacije "odozgo na dole" (Wager et al., 2008). Temporalni, inferiorni parijetalni i ventromedijalni prefrontalni regioni koji se aktiviraju tokom zadataka ponovne procene smatraju se delom „semantičkog sistema“ i mogu odražavati oporavak i primenu kontekstualnog i socio-emocionalnog znanja neophodnog za ponovnu procenu značenja emocionalnog stimulusa (Wager et al., 2008).

Emocionalna supresija predstavlja strategiju emocionalne regulacije koja deluju direktno na samo emocionalno stanje. Emocionalna supresija se još naziva i strategije modulacije odgovora. Ova strategija uključuje napore da se inhibiraju ponašanja povezana sa izražavanjem emocija (npr. izrazi lica) (McRae and Gross, 2020). Može se operacionalizovati i analizirati kao supresija emocija merena upitnicima (Skala emocionalne regulacije) ili kao učestalost upotrebe emocionalne supresije u svakodnevnom životu merena ekološkom trenutnom procenom (McMahon and Naragon-Gainey, 2020).

Manipulacija emocionalnom supresijom se u laboratorijskom uslovima sprovodi tako što se ispitanici izlažu određenim stimulansima (npr. "negativne" slike) i eksplicitno im se nalaže da potisnu svoje emocionalno ponašanje (npr. izražavanje emocija na licu), što se zatim upoređuje sa opozitnom situacijom (npr. gledanje "negativnih" slika bez regulisanja sopstvenih emocija). Stepem do kojeg ispitanik može da prati ova uputstva odražava sposobnost regulacije emocija ili uspeh (McRae and Gross, 2020). Studije su pokazale da ljudi koji hronično potiskuju emocije i koriste strategiju emocionalne supresije imaju veću incidencu pojave stresa, anksioznosti i depresije (Liverant et al., 2022; Mohiyeddini et al., 2014; Cavicchioli et al., 2021). Supresija se zbog toga smatra neadekvatnom strategijom regulacije emocija sa evidentnim dokazima da je povezana sa izraženom simpatičkom i kardiovaskularnom aktivnošću, povećanom aktivacijom amigdala i insula, kao i povećanom akustičnom senzacijom na nepoznate zvukove (Roberts et al., 2008; Muhtadie et al., 2021; Hagemann et al., 2006). Studije o emocionalnoj supresiji u kojima je korišćen upitnik ili ekološka trenutna procena pružaju naučne dokaze o štetnim efektima korišćenja ove strategije. One pokazuju da je upotreba ove strategije povezana sa nižim nivoom pozitivnog afekta, višim nivoima negativnog afekta, nižim optimizmom i životnim zadovoljstvom, nižem blagostanjem i samopoštovanjem, povećanim negativnim razmišljanjem, smanjenim zadovoljstvom u emotivnim odnosima, povećanim osećajem usamljenosti, lošijom socijalnom podrškom, višim rizikom od kardiovaskularnih bolesti, izmenjenim funkcionisanjem imunog sistema, pa čak i povećanim stepenom mortaliteta (Lopez et al., 2020; Mroczek et al., 2015; Silva et al., 2018; Cameron and Overall, 2018).

Zbog svih ovih efekata, supresija emocija se obično smatra neadekvatnom strategijom regulacije emocija. Ipak, upotreba emocionalne supresija u pojedinim kontekstima može biti značajna. Ova strategija emocionalne regulacije ima negativne rezultate za ljude iz zapadnih kultura, ali ne nužno za ljude iz istočnih kultura ili za one koji poštuju "azijske vrednosti" (Yuan et al., 2014; Ip et al., 2021). U nekim situacijama, društvene norme mogu zahtevati potiskivanje izražavanja nečijih emocija, kao što je manje pokazivanje pozitivnih emocija prilikom pobede na takmičenju ili postignutog gola prilikom utakmice (Kalokerinos et al., 2014). Supresija emocija takođe može biti poželjna za određene profesije, kao što su lekari, koji mogu koristiti emocionalnu supresiju (izmenjen izraz lica) kao odgovor na negativne stimulse (npr. posmatranje patnje kod pacijenata) da bi optimalno obavljali svoj posao (Weilenmann et al., 2018).

1.3.3. Povezanost mentalnog distresa i imunskog sistema

Imunski sistem nije samoregulisan već funkcioniše u bliskoj vezi sa nervnim sistemom. Ova povezanost je prisutna na različitim nivoima organizacije. Na lokalnom nivou, postoje jasni naučni dokazi za sintezu i korišćenje velikog broja faktora imunskog sistema od strane centralnog nervnog sistema kao i za sintezu i korišćenje neuroendokrinih medijatora od strane imunskog sistema.

Interakcije kratkog dometa između imunih ćelija i perifernih nervnih završetaka koji inervišu imune organe omogućavaju imunološkom sistemu da regrutuje lokalne neuronske elemente koji služe za podešavanje imunološkog odgovora. Recipročno, imune ćelije i medijatori imunskog sistema imaju značajnu regulatornu ulogu u nervnom sistemu i učestvuju u eliminaciji i plastičnosti sinapsi tokom razvoja, kao i u sinaptičkoj plastičnosti u odraslom dobu. Na nivou celog organizma, dugotrajne interakcije između imunih ćelija i centralnog nervnog sistema omogućavaju imunološkom sistemu da angažuje druge organske sisteme u borbi protiv infekcije patogenim mikroorganizama i omogućava nervnom sistemu da reguliše imunitet. Promene u komunikacionim putevima između imunog sistema i nervnog sistema mogu objasniti mnoga patološka stanja koja su u početku bila pripisana isključivo disfunkciji organa (Dantzer, 2018).

Sve je više dokaza koji sugerišu direktnu vezu između različitih komponentni mentalnog distresa i imunskog sistema, i zbog toga je povezanost mentalnog distresa kao disfunkcije nervnog sistema i imunskog sistema do sada bila predmet brojnih istraživanja u svetu. Veliki broj naučnih studija je pokazalo da depresija, anksioznost, stres i emocionalna regulacija kao glavni elementi mentalnog distresa mogu značajno uticati na imuni sistem na više načina (Beurel et al., 2020; Ray et al., 2017; Lopez et al., 2018). Mentalni distres predstavlja opterećenje mentalnih i organskih funkcija uzrokovano nepovoljnim i zahtevnim stimulusima unutar i izvan tela. On posledično uzrokuje adaptivne biološke odgovore čiji je osnovni cilj da održavaju homeostazu u fiziološkim granicama. U situacijama kad su pojedine komponentne mentalnog distresa prolongirane i visoko intenzivne, poput stresa, značajno se povećava incidenca razvoja kako drugih komponentni mentalnog distresa, tako i velikog broja organskih bolesti (kardiovaskularne bolesti, dijabetes tipa 2, metabolički sindrom, autoimune bolesti) (McEwen, 2017). Reakcija organizma na mentalni distres je posredovana složenom interakcijom nervnih, endokrinih i imunoloških mehanizama preko dve glavne osovine distresa i njihovih odgovarajućih krajnjih proizvoda. Prva osovina je hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (HHN) sa svojim glukokortikoidnim hormonom kortizolom, dok drugu osovinu predstavlja simpatički nervni sistem sa svojim hormonima adrenalinom i noradrenalinom (Mifsud and Reul, 2018). U zavisnosti od dužine trajanja mentalnog distresa, ove dve osovine izazivaju drugačije efekte na imuni sistem. Studije na glodarima, uglavnom sa prolongiranim i ponovljenim mentalnim stresom su pokazale da stres menja broj leukocita, njihova svojstva i distribuciju (Ince et al., 2018; Poller et al., 2022). Generalno, hronični mentalni stres smanjuje broj limfocita stečenog imuniteta, kao što su T ćelije i B ćelije, dok povećava broj ćelija urođenog imuniteta, kao što su neutrofili i monociti, u krvi i koštanoj srži. Ove promene mogu biti posledica izmenjene diferencijacije i proliferacije leukocita u koštanoj srži i njihovog ulaska u cirkulaciju. Međutim, ne ponašaju se sve podgrupe leukocita isto nakon prestanka stresa.

Porast neutrofila i smanjenje B ćelija održavaju se od nekoliko sati pa do nekoliko dana nakon poslednjeg stresa, dok druge promene u broju leukocita nestaju (Ishikawa et al., 2021). Akutni mentalni stres izaziva slične promene u leukocitima kao i hronični stres, pošto su smanjenje limfocita i povećanje mijeloidnih ćelija primetni odmah nakon jednočasovnog izlaganja stresu. Međutim, efekti akutnog stresa su kratkotrajniji. Samo povećanje neutrofila, ali ne i povećanje monocita, primećeno je 12 sati nakon jednosatnog izlaganja stresu (Wohleb, 2013). Ovi nalazi pokazuju da hronični stres izaziva dugotrajnije promene leukocita u odnosu na akutni stres i da povećanje broja neutrofila traje duže od promena u drugim podskupovima leukocita.

Stresom izazvana mobilizacija leukocita iz koštane srži uglavnom je posredovana autonomnim i neuroendokrinim sistemima. Aktivacija simpatičkog nervnog sistema nakon stresa dovodi do povećanog lučenja noradrenalina i adrenalina iz medule nadbubrežne žlezde u cirkulaciju i povećane sekrecije noradrenalina iz simpatičkih nerava i na taj način rezultira povišenim nivoima noradrenalina u organizmu. Oslobođeni noradrenalin i adrenalin stupaju u interakciju sa α -adrenergičkim i β -adrenergičnim receptorima, prisutnim u centralnom nervnom sistemu i na ćelijskoj membrani leukocita i drugim organima u celom telu. Noradrenalin i adrenalin, kada se jednom otpuste, vezuju se za specifične G-proteinske receptore vezane za membranu da bi pokrenuli intracelularni cAMP signalni put koji brzo aktivira ćelijske odgovor (Chu et al., 2022). Nakon oslobađanja, neurotransmiteri aktiviraju adrenergičke receptore na leukocitima i njihovim okolnim ćelijama (npr. mezenhimskim matičnim ćelijama u koštanoj srži), što dovodi do mobilizacije leukocita izazvane stresom (Muhlen et al., 2014). Neutrofilni granulociti na membrani imaju veliki broj beta adrenergičkih receptora i na ovaj način adrenalin može uticati ne samo na fagocitozu, već i na pokretljivost neutrofila, hemotaksu i produkciju citokina. Aktivacija simpatikusa može biti dovoljna za ove efekte, što je dokazano u studiji McKim i saradnika, da sistemska administracija izoprenalina, neselektivnog β -adrenergičkog agoniste, smanjuje broj limfocita i povećava broj monocita i neutrofila u koštanoj srži (McKim et al., 2018). Farmakološka inhibicija β_2 i β_3 adrenergičkih receptora potiskuje mobilizaciju mijeloidnih ćelija izazvanu stresom, što ukazuje na njihovu ključnu ulogu.

Uzimajući u obzir samo hipotalamus-hipofizno-nadbubrežnu osovinu, možemo primetiti da se oslobađanje kortizola u uslovima akutnog stresa prvo povećava, a zatim smanjuje, umesto toga tokom hroničnog stresa kortizol nema cirkadijalni ritam. Ovo dovodi do rezistencije na glukokortikoide gde je povećanje kortizola povezano sa nedostatkom efekta, tj. sa neadekvatnim reagovanjem glukokortikoidnih receptora i njihovom desenzibilizacijom. Kortizol je nazvan "hormonom stresa" jer pojačava "reakciju alarma", međutim, mali porast koncentracije ovog hormona nije opasan po zdravlje jer kortizol reguliše brojne funkcije organa u telu (Miller, 2018). Kortizol ima izrazit cirkadijalni ritam, koji reguliše centralni pejsmejker lokalizovan u suprahijazmatskom jezgru, koji aktivira osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlezda (HHN). Ova osovina igra važnu ulogu u kontroli

inflamacije, odnosno urođenog imuniteta, preko kortizola. Ovaj hormon, preko svojih receptora koji se nalaze u velikom broju na svim imunim ćelijama ima brojne imunomodulatorne efekte. Pre svega deluje kao antiinflamatorni agens tako što indukuje apoptozu u monocitima, makrofagima i T ćelijama (Nicolaidis et al., 2015). Glukokortikoidi povećavaju nivoe antiinflamatornih citokina i smanjuju nivoe proinflamatornih citokina. Monociti tretirani kortikosteroidima smanjuju proizvodnju interleukina 12 (IL-12), što je rezultiralo smanjenim kapacitetom monocita da indukuju sintezu interferon gama (IFN- γ), i povećanom sposobnošću da indukuju sintezu interleukina 4 (IL-4) u T ćelijama. Deksametazon, koji je selektivni glukokortikoidni agonist, povećava nivoe mRNA IL-4, interleukina 10 (IL-10), interleukina 13 (IL-13), smanjuje sintezu IFN- γ i faktora nekroze tumora alfa (TNF- α) (Kim et al., 2016). Ovaj mehanizam inflamacije se javlja u bazalnom stanju, i u stanjima akutnog i kratkotrajnog stresa, dok se u okolnostima prolongiranog stresa može aktivirati drugačiji skup mehanizama, što dovodi do intenziviranja inflamacijskog odgovora u vezi sa HHN osovinom. Ovaj proces je nazvan rezistencija na glukokortikoide, jer se čini da imune ćelije postaju manje osetljive na efekte glukokortikoida, zbog izloženosti hroničnom stresu. Kada se razvije rezistencija na glukokortikoide, reakcije „bori se ili beži“ na stres se menjaju i određuju pro-inflamatorni odgovor. Ova rezistencija izazvana hroničnim stresom može da izazove smanjenje antiinflamatornih dejstava i da produži inflamatorni proces (Cohen et al., 2001). Sve navedeno značajno menja aktivnost stečenog imunskog sistema, T ćelija i B ćelija, što dovodi do oslabljenog imunološkog odgovora i povećane osetljivosti na infekcije. Dolazi do povećane proizvodnje proinflamatornih citokina, kao što su interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 6 (IL-6) i TNF- α . U stanjima hroničnog izlaganja kortizolu povećana je incidenca od autoimunih bolesti jer kortizol potiskuje aktivnost imunih ćelija adaptivnog imuniteta koje pomažu u sprečavanju autoimunih reakcija (Ishikawa and Furuyashiki, 2022).

Tokom mentalnog distresa, i mnogi drugi hormoni poput hormona rasta i prolaktina, značajno utiču na funkciju polimorfonuklearnih leukocita. Hormon rasta u nekim eksperimentalnim uslovima može da poveća proizvodnju slobodnih kiseoničnih radikala u polimorfonuklearnim ćelijama i na taj način pojača njihovo antibakterijsko dejstvo. Prolaktin ponekad dovodi do značajnih proinflamatornih efekata u različitim tkivima i povećava sposobnost fagocitoze. Svi ovi hormoni u neutrofilnim granulocitima pokreću kompleksne signalne puteve koji mogu da utiču na ekspresiju velikog broja gena (Husband, 2020). Dokazano je da mentalni distres aktivira mikrogliju, povećava ekspresiju proinflamatornih medijatora u mozgu i indukuje moždanu infiltraciju monocita kroz krvno-moždanu barijeru (Weber, 2007). Pacijenti sa depresijom pokazuju patološki odgovor urođenog imunološkog sistema na periferiji i u mozgu, što je ilustrovano povećanjem neutrofila, monocita i inflamatornih medijatora u krvi (Lynall et al., 2020). Ove studije su posledični dokazi da je povezanost mentalnog distresa i imunog sistema dvosmerna i jako kompleksna, i da je potrebno više naučnih istraživanja koja bi istraživala ovu povezanost.

Rezultati naučnih studija sugerišu da je veliki broj patofizioloških efekata distresa na zdravlje i rizik od bolesti u velikoj meri posredovan brzinom ubrzanog starenja imunog sistema (imunosenescencija). Ovaj proces karakteriše nesposobnost da se uspostavi odgovarajući i efikasan imuni odgovor na stimulus, a povezan je sa hroničnim proinflamatornim stanjem niskog stepena. Mnoge imunološke promene povezane sa starenjem podsećaju na one uočene nakon dugotrajnog ili hroničnog izlaganja stresu uključujući „nerešavajuću“ inflamaciju i povišeni oksidativni stres (De Punder et al., 2019). Starenje ćelije imunog sistema može se indeksirati dužinom telomera, koji su specijalizovani kompleksi nukleinske kiseline i proteina koji pokrivaju krajeve linearne DNK i štite DNK od oštećenja. Zbog „problema krajnje replikacije“, završni deo telomera ne uspeva da se replicira tokom svake ćelijske deobe, zbog čega telomere postaju progresivno kraće. Kada telomere dostignu kritično kratku dužinu, ćelije postaju podložne starenju ili apoptozi. Skraćanju telomera se suprotstavlja ćelijski enzim telomeraza koji dodaje telomernu DNK, čime se čuva dužina telomera i fiziološka funkcija ćelije. Ubrzano skraćivanje može biti posledica uticaja mentalnog distresa na poremećaj HHN osovine i na patološki odgovor imunog sistema. Ove disregulacije verovatno doprinose skraćivanju telomera povećanjem oksidativnog stresa, koji zauzvrat oštećuje telomere (Vitlic et al., 2014; Lin and Epel, 2022; De Punder et al., 2019). Studije su pokazale da osim stresa, depresija i anksioznost imaju veliku ulogu u ovom mehanizmu oštećenja imunog sistema (Verhoeven et al., 2015; Akay, 2022; Bazaz et al., 2021).

Neutrofilni granulociti predstavljaju najbrojniju vrstu leukocita periferne krvi i značajna su komponenta urođenog imunskog odgovora. Ove ćelije su odgovorne za sekreciju velikog broja hemijskih medijatora od kojih neki direktno ili indirektno učestvuju u borbi protiv patogenih mikroorganizama, dok drugi doprinose procesu inflamacije. Poslednjih godina, sve je više dokaza da su neutrofilni granulociti izuzetno važni za normalno funkcionisanje centralnog nervnog sistema, kao i da njihova disfunkcija može doprineti nastanku neuroloških i mentalnih poremećaja, kao i obratno (Aronowski and Roy-O'Reilly, 2019). Epigenetske promene u jedrima ovih ćelija, odnosno promene u transkripciji pojedinih gena, mogu u nekim slučajevima izazvati drastične promene u sekreciji hemijskih medijatora, a to se može odraziti na stepen inflamacije u različitim tkivima i organima. Iako postoji veliki broj istraživanja ovih fenomena, još uvek nije u potpunosti jasno na koji način mentalni distres dovodi do ovih i drugih morfoloških i funkcionalnih promena neutrofilnih granulocita.

Važno je napomenuti da je interakcija između imunog sistema i mentalnog distresa složen proces koji nije u potpunosti istražen. Neuroimunologija je jedna od najbrže rastućih oblasti u medicinskim naukama, jer popunjava jaz između dva glavna sistema organizma, nervnog sistema i imunog sistema. Oba sistema utiču jedni na druge kroz dvosmerne interakcije, jer mentalni distres može dovesti do poremećaja u funkcionisanju imunog sistema, a takođe i specifične modulacije u aktivnostima imunog sistema, kao što je neuroinflamacija, mogu dovesti do razvoja određenih komponenti mentalnog distresa.

Zbog toga je potrebno više istraživanja koja bi bila usmerena na zavisno-posledični odnos ove dve vitalno značajne komponente homeostaze, da bi se u potpunosti razumeli mehanizmi koji leže u osnovi ove veze i da bi se identifikovala potencijalna terapija za mentalni distres koji utiče na imuni sistem, i obratno. Naša studija može pomoći u razumevanju ove veze, i dati model za brzu identifikaciju mentalnog distresa na osnovu promenjene strukture neutrofilnih granulocita.

1.4. Fizička aktivnost

1.4.1. Definicija fizičke aktivnosti

U sklopu ispravnog definisanja termina fizičke aktivnosti prvo moramo razmotriti pojmove koji se koriste u stručnoj terminologiji, a to su: fizička aktivnost, fizičko vežbanje, fizička spremnost i sport.

Fizička aktivnost (FA) se definiše kao svaki telesni pokret izazvan kontrakcijom skeletnih mišića koja povećava potrošnju energije iznad bazalnog nivoa (Caspersen et al., 1985). Količina energije potrebna da se izvrši fizička aktivnost može se izraziti kroz potrošnju kilokalorija (kcal) ili u jedinicama metaboličkog ekvivalenta (MET). Jedan MET se definiše kao količina energije koja se troši u mirovanju, što je približno 3,5 mililitara kiseonika po kilogramu telesne težine u minuti ($\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}\text{min}^{-1}$), što odgovara utrošku energije od $1 \text{ kcal}\cdot\text{kg}^{-1}\text{min}^{-1}$ (Ainsworth et al., 2011). Ukupna energetska potrošnja tokom fizičke aktivnosti određena je količinom mišićne mase koja učestvuje u pokretu, kao i intenzitetom, trajanjem i učestalosti mišićnih kontrakcija. Metabolički ekvivalenti se koriste za kategorizaciju intenziteta FA: fizičkih aktivnosti niskog intenziteta (gledanje televizije, ležanje, rad za stolom, kupovina namirnica, spora šetnja), FA umerenog intenziteta (spora vožnja bicikla, košenje travnjaka) i fizičke aktivnosti visokog intenziteta (brza vožnja bicikla, trčanje, penjanje uz brdo) (Dhuli et al., 2022). FA obuhvata širok spektar aktivnosti i podrazumeva bilo koju vrstu fizičkog rada. Hodanje kao vrsta aktivnosti može uključivati hodaње na otvorenom, po ravnom, uzbrdo ili nizbrdo, ili hodaње na traci za trčanje. Tipični tipovi fizičke aktivnosti koji se odnose na fizičko vežbanje uključuju hodaње, vožnju bicikla, plivanje ili trčanje, jer imaju specifične obrasce kretanja i definisanu potrošnju energije u vezi sa obavljanjem takvih aktivnosti. Fizička aktivnost takođe uključuje niz ponašanja kao što su npr. hodaње do autobuske stanice, baštovanstvo i izgradnja zida od cigle. Dakle, „ukupna fizička aktivnost“ uključuje sve aktivnosti iz različitih domena, kao što su „aktivni prevoz“, aktivnosti u domaćinstvu, fizičke aktivnosti u slobodno vreme i profesionalne fizičke aktivnosti. Aktivnosti u slobodno vreme mogu se dalje podeliti na kategorije kao što su takmičarski sportovi, rekreativne aktivnosti (npr. planinarenje, biciklizam) i fizičko vežbanje.

Fizička aktivnost može biti kategorisana kao FA za razvoj izdržljivosti i fizička aktivnost za jačanje mišića. Dalje klasifikacije FA su metabolički povezane (aerobne naspram anaerobne vežbe) ili one vezano za vrstu mišićne

kontrakcije: izotonična kontrakcija protiv otpora u kome se dužina mišića skraćuje (koncentrično) ili produžava (ekscentrično) i izometrijska (statična ili FA bez promena dužine mišića) (Patel et al., 2017). Fizička aktivnost u svakodnevnom životu i fizičko vežbanje su uglavnom aerobne aktivnosti, gde se većina proizvodnje energije odvija metaboličkim putevima zavisnim od kiseonika. Aerobna FA se odnosi na aktivnost koja se izvodi intenzitetom koji omogućava da metabolizam koristi uskladištenu energiju uglavnom u obliku ugljenih hidrata kroz proces aerobne glikolize. Pored glikolitičkog puta, dobijanje energije iz metabolizma masti (β -oksidacija), takođe je uključeno tokom aerobne FA. Aerobna FA uglavnom uključuje velike mišićne grupe koje izvode dinamičke aktivnosti, što dovodi do značajnog povećanja srčane frekvencije i potrošnje energije. Primeri aerobnih vežbi uključuju sve aktivnosti koje se sprovode niskim do umerenim intenzitetom (vožnju bicikla, trčanje, plivanje) (Patel et al., 2017). Aerobna fizička aktivnost je vrsta aktivnosti koja se obično povezuje sa izdržljivošću, kondicijom i brojnim povoljnim zdravstvenim efektima.

Fizička aktivnost koja jača mišiće se u literaturi naziva „trening snage“ ili „trening sa otporom“ i predstavlja oblik fizičke aktivnosti/vežbanja koji je prvenstveno namenjen održavanju ili poboljšanju mišićne snage i povećanju ili održavanju mišićne mase (Malm et al., 2019). Definiše se kao fizička aktivnost koja poboljšava funkciju mišića, koja je važna za održavanje ili poboljšanje koordinacije i ravnoteže, posebno kod starijih (Muehlbauer et al. 2015). Prema definiciji, aktivnosti za jačanje mišića prvenstveno uključuju anaerobne (bez utroška kiseonika) energetske sisteme organizma, proporcionalno više kako se intenzitet povećava. Anaerobna FA se odnosi na pokrete koji se izvode velikim intenzitetom koji nisu metabolički održivi korišćenjem energije dobijene putem aerobnih izvora, i koji zahtevaju da se metabolizam uskladištene energije uglavnom obradi anaerobnom glikolizom. Primer anaerobne FA su visoko intenzivne vežbe.

Fizičko vežbanje kao termin je dugi niz godina korišćen naizmenično sa "fizičkom aktivnošću", i, u stvari, oba imaju niz zajedničkih elemenata (Tabela 1). I fizička aktivnost i vežbanje uključuju bilo koji telesni pokret koji stvaraju skeletni mišići koji troše energiju, i u pozitivnoj su korelaciji sa fizičkom spremnošću kako se povećava intenzitet, trajanje i učestalost pokreta (Caspersen et al., 1985). Fizičko vežbanje, nije sinonim za fizičku aktivnost: to je potkategorija fizičke aktivnosti. Fizičko vežbanje je fizička aktivnost koja je planirana, strukturisana, ponavljajuća i svrsishodna u smislu da je krajnji cilj fizičkog vežbanja poboljšanje ili održavanje jedne ili više komponenti fizičke spremnosti (Caspersen et al., 1985). Fizičke vežbe treba razlikovati na osnovu vremenskih karakteristika na akutne fizičke vežbe (pojedinačna sesija) i hronične fizičke vežbe (ponovljene sesije akutnih vežbi). Jedna sesija fizičkog vežbanja se obično naziva „akutnim (pojedinačnim) efektom fizičkog vežbanja“ ili „akutnim fizičkim vežbama“ (Budde et al., 2016). Štaviše, hronične fizičke vežbe se mogu označiti kao „fizički trening“ kada se sprovode redovno na planiran, strukturiran i svrsishodan način sa ciljem povećanja (ili održavanja) individualnih sposobnosti u jednoj ili više dimenzija fizičke spremnosti.

Tabela 1. Elementi fizičke aktivnosti i fizičkog vežbanja (preuzeto i prevedeno iz Caspersen et al., 1985).

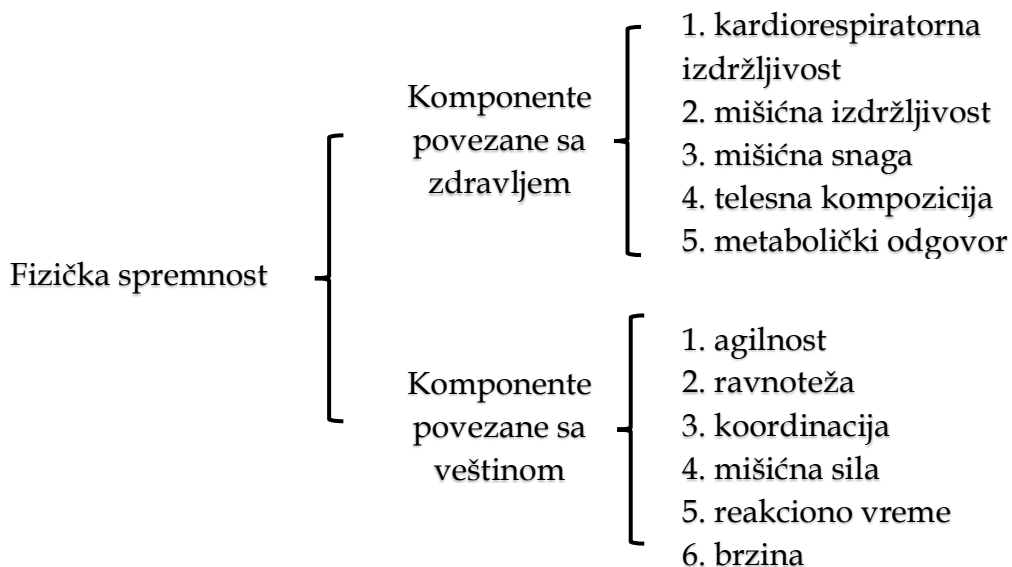
Fizička aktivnost	Fizičko vežbanje
1. Telesni pokret izazvan kontrakcijom skeletnim mišića	1. Telesni pokret izazvan kontrakcijom skeletnim mišića
2. Rezultira potrošnjom energije	2. Rezultira potrošnjom energije
3. Potrošnja energije u kcal varira od niskog do visokog	3. Potrošnja energije u kcal varira od niskog do visokog
4. Postoji pozitivna korelacija za fizičkom spremnošću	4. Postoji visoko pozitivna korelacija za fizičkom spremnošću
	5. Planirana, strukturisana, ponavljajuća i svrsishodna fizička aktivnost
	6. Cilj da se poboljšaju ili očuvaju komponente fizičke spremnosti

Fizička spremnost, fizička kondicija, forma, fizički fitnes je u korelaciji sa fizičkom aktivnošću, koja je povezana sa pokretima koje ljudi izvode. Fizička spremnost se definiše kao skup atributa koje ljudi imaju ili postižu, a koji se odnose na sposobnost obavljanja fizičke aktivnosti. Biti fizički spreman je definisano kao „sposobnost da se obavljaju svakodnevni zadaci energično, bez preteranog zamora i sa dovoljno energije za uživanje u aktivnostima u slobodno vreme i suočavanje sa nepredviđenim hitnim situacijama“ (Caspersen et al., 1985). Fizička spremnost u vezi sa zdravljem se odnosi na stepen do kojeg pojedinac poseduje osobine i kapacitete povezane sa niskim rizikom od razvoja hipokinetičkih bolesti i stanja i uključuje morfološke, mišićne, metaboličke, motoričke i kardiorespiratorne osobine (American College of Sports Medicine, 2014).

Komponente fizičke spremnosti se u zavisnosti od fokusa i cilja mogu klasifikovati u dve grupe: prva grupa komponente koje su u direktnoj korelaciji sa zdravljem, i druga grupa komponenti koje se povezuje za veštinom izvođenja određene aktivnosti (Wilder et al., 2006). Komponente fizičke spremnosti koje su u vezi sa zdravljem su kardiorespiratorna izdržljivost (maksimalna aerobna sposobnost, očuvana funkcija srca i pluća, fiziološke vrednosti krvnog pritiska), mišićna izdržljivost i mišićna snaga, morfološka komponenta (telesna masa u odnosu na telesnu visinu, sastav tela, distribucija potkožnih masti, procenat abdominalnih visceralnih masti, gustina kostiju i fleksibilnost) i metabolička komponenta (tolerancija na glukozu, osetljivost na insulin, metabolizam lipida i lipoproteina, karakteristike oksidacije supstrata) (Wilder et al., 2006).

Komponente povezane sa veštinom izvođenja određene aktivnosti su: agilnost, ravnoteža, koordinacija, sila, reakciono vreme, brzina i fleksibilnost (shema 1)

Shema 1. Komponente fizičke sposobnosti (preuzeto i prevedeno iz Caspersen et al., 1985)



Nivo fizičke spremnosti, kao i intenzitet fizičke aktivnosti, može da varira od niskog do visokog. Važno je napomenuti da komponente fizičke spremnosti povezane sa zdravljem nisu u direktnoj zavisnosti. Na primer, osoba može imati razvijenu mišićnu snagu, ali u isto vreme može biti nefleksibilna (primer sportista koji se bave dizanjem tegova). Pet komponenti fizičke kondicije koje se odnose na zdravlje značajnije su za pozitivne zdravstvene benefite od onih koje se odnose na veštinu izvođenja aktivnosti. Relativni značaj bilo koje komponente koja je povezana sa zdravljem zavisi od stepena spremnosti ili zdravstvenog cilja.

Sport je definisan kao organizovano bavljenje fizičkom aktivnošću, koje se može izvoditi pojedinačno ili kao deo tima, gde učesnici imaju jasno definisan cilj, koji je regulisan pravilima i orjentisan prema rezultatima (Malm et al., 2019). Sport se može organizovati prema uzrastu, polu, nivou ambicija, kompleksnosti ili drugim karakteristikama, i može imati amaterski ili profesionalni takmičarski karakter. Prema definiciji Evropskog kardiološkog društva sportista je „pojedinač dečijeg ili adultnog uzrasta, koji se redovno bavi fizičkim vežbanjem i učestvuje u zvaničnom sportskom takmičenju, bilo amaterski ili profesionalno“ (Pelliccia et al., 2021). Američko udruženje za srce definiše sportistu takmičara kao pojedinca koji je uključen u redovne (obično visoko intenzivne) sportske aktivnosti koje su organizovane individualno ili u sklopu timskih sportova, sa akcentom na takmičenje i sportski učinak (Maron et al., 2007).

Sportisti koji su uključeni u redovne takmičarske aktivnosti obuhvataju širok dobni spektar i mogu se takmičiti na omladinskom, srednjoškolskom, akademskom, univerzitetskom, poluprofesionalnom, profesionalnom, nacionalnom, međunarodnom i olimpijskom nivou.

Rekreativni sportisti se bave sportom radi razonode i u sklopu fizičkih aktivnosti u slobodno vreme, dok je sportista takmičar visoko utreniran sportista sa akcentom na razvijanje sportskih sposobnosti u cilju pobeđe na takmičenju. U predloženoj klasifikaciji sportista zasnovanoj na minimalnom obimu fizičke aktivnosti, „elitni“ sportisti (profesionalni sportisti, olimpijci i sportisti koji se takmiče na internacionalnom nivou) uglavnom upražnjavaju vežbanje ≥ 10 h/nedeljno; „takmičarski“ sportisti (srednjoškolski, akademski, univerzitetski sport) upražnjavaju vežbanje ≥ 6 h/nedeljno; i „rekreativni“ sportisti vežbaju ≥ 4 h/nedeljno (McKinney et al., 2019).

1.4.2. Opšte uloge fizičke aktivnosti

Fizička aktivnost je decenijama prepoznata po svojoj aktivnoj ulozi u poboljšanju svih komponenti fizičke spremnosti i održavanju zdravlja u celini. Redovna FA poboljšava sve aspekte ljudskog zdravlja široko je prihvaćena kao preventivna i terapijska strategija za hronične nezarazne bolesti (World Health Organization, 2020). U literaturi je dokumentovano da FA održava i obnavlja homeostazu na nivou organizma, tkiva, ćelija i molekula kako bi se stimulisale pozitivne fiziološke adaptacije koje posledično štite od različitih patoloških stanja (Oiu et al., 2023). Fiziologija FA je složena i uključuje adaptivne odgovore više sistema organa. Fizička aktivnost predstavlja evolucionu prednost preživljavanja koja moduliše skeletne mišiće u generatore energije, i na taj način obezbeđuje energiju za sve fiziološke procese. Fizička aktivnost je dinamična aktivnost koja zahteva energiju i koja ne utiče samo na kardiovaskularni, respiratorni i mišićno-skeletni sistem, već značajno utiče i na imunološki, nervni i endokrini sistem (Hawley et al., 2014).

Efekti fizičke aktivnosti i vežbanja mogu biti neposredni (u toku i neposredno posle FA), ali i dugotrajni ukoliko je fizička aktivnost redovna (efekti nakon redovne fizičke aktivnosti imaju dugoročne benefite po zdravlje). Kao primer, aktivnost specifičnih mišićnih enzima može se brzo povećati u toku i neposredno nakon FA, ali isto tako brzo se može izgubiti u po prestanku FA (Bogdanis, 2012). Druge promene ostaju mesecima ili godinama čak i ako se FA ne upražnjava - kao npr. povećan broj i veličina mišićnih vlakana i krvnih sudova (Gundersen, 2016). Za zdravstveno povoljne efekte potrebno je da se fizička aktivnost obavlja u kontinuitetu i sa progresijom. Većina sprovedenih fizičkih vežbi/treninga je kombinacija vežbi izdržljivosti i vežbi za jačanje mišića i teško je odrediti njihov pojedinačan uticaj na zdravlje. Ranije je većina naučnih studija prikupljala podatke samo o vežbama izdržljivosti. Međutim, naučne studije su dokazale da i vežbe otpora pokazuju pozitivne efekte na zdravlje (mentalno i fizičko) i prevenciju bolesti (Gordon et al., 2017; Keileni et al., 2017; Yamamoto et al., 2016).

Redovne fizičke aktivnosti umerenog intenziteta, kao što su vežbe snage, izdržljivosti, ravnoteže, fleksibilnosti i koordinacije, imaju zdravstveno povoljne efekte na zdravlje i široko su prihvaćene kao terapijska i preventivna strategija za hronične nezarazne bolesti. Rezultati velikog broja naučnih studija podržava konsenzus da redovna fizička aktivnost ima značajnu ulogu u smanjenju rizika od nastanka i progresije psihijatrijskih bolesti (depresija, anksioznost, stres, šizofrenija), imunoloških i autoimunih bolesti, neuroloških bolesti (demencija, Parkinsonova bolest, multipla skleroza), metaboličkih bolesti (gojaznost, hiperlipidemija, metabolički sindrom, sindrom policističnih jajnika, dijabetes tipa 2, dijabetes tipa 1), kardiovaskularnih bolesti (hipertenzija, koronarna bolest srca, srčana insuficijencija), cerebrovaskularni insult, bolesti respiratornog sistema (hronična opstruktivna bolest pluća, astma, cistična fibroza), mišićno-skeletnih poremećaja (osteoartritis, osteoporoza, bol u leđima, reumatoidni artritis, sarkopenija), kao i pojedinih tipovima karcinoma (karcinom kolona i karcinom prostate) (El Assar et al., 2022; Pedersen and Saltin, 2015; Elagizi et al., 2020; Schuch and Vancampfort, 2021; Tsukita et al., 2022; Teich et al., 2019; Tian et al., 2022; Beaudart et al., 2017; . Ballon-Landa and Parsons, 2018; Izquierdo et al., 2021; Thompson et al., 2020).

Epidemiološke studije pokazuju da je umeren nivo fizičke aktivnosti povezan sa nižim rizikom od smrtnosti kod osoba sa ili bez kardiovaskularnih bolesti (Jeong et al., 2019). Štaviše, redovna fizička aktivnost i vežbanje su povezani sa smanjenim rizikom od negativnih zdravstvenih ishoda uopšte (npr. nivo invaliditeta, smrtnost) i sa boljim preživljavanjem (Pedersen and Saltin, 2015; Mok et al., 2019; Harridge and Lazarus, 2017). Vežbanje može delimično da moduliše hronična stanja i multimorbiditet povezan sa niskom fizičkom aktivnošću i može se koristiti kao preventivni pristup za poboljšanje kvaliteta života (Oiu et al., 2023). Veća frekvencija i veći intenzitet fizičke aktivnosti, kao i različite vrste fizičke aktivnosti (npr. aerobne aktivnosti, aktivnosti za jačanje mišića i kostiju), su povezane sa višestrukim pozitivnim zdravstvenim benefitima (npr. povećanje kardiorespiratorne kondicije, snage i mase mišića, povećanje gustine kostiju, efikasniji metabolički sistem) (Chaput et al., 2020).

Međutim, ako fizička aktivnost ne zadovoljava minimalni nivo intenziteta, ne treba očekivati značajne fiziološke promene organa i organskih sistema koje mogu uticati povoljno na zdravlje. Sa druge strane, kod pojedinaca koji tek počinju sa fizičkom aktivnošću, visoko intenzivna FA može dovesti do neželjenih kardiovaskularnih događaja, a produženo intenzivno vežbanje može povećati incidenciju infarkta (Franklin et al., 2020). Stoga su intenzitet i način vežbanja od kritične važnosti za postizanje pozitivnih efekata na zdravlje. Za značajne zdravstvene benefite, Svetska zdravstvena organizacija preporučuje da odrasli obavljaju najmanje 150 minuta FA umerenog intenziteta ili 75 minuta aerobne fizičke aktivnosti visokog intenziteta nedeljno, ili ekvivalentnu kombinaciju aerobne fizičke aktivnosti umerenog i visokog intenziteta (World Health Organization, 2020). Za dodatne zdravstvene benefite, odraslima se preporučuje da povećaju aerobnu fizičku aktivnost umerenog intenziteta na više od 150 minuta

nedeljno ili da obavljaju više od 75 minuta aerobne fizičke aktivnosti visokog intenziteta tokom cele nedelje ili ekvivalentnu kombinaciju aktivnost umerenog i visokog intenziteta. Odraslima se takođe preporučuje da upražnjavaju aktivnosti jačanja mišića koje uključuju sve glavne mišićne grupe 2 ili više dana nedeljno umerenim ili visokim intenzitetom. Pored aerobnih aktivnosti, odraslima od 65 godina i starijima preporučuje se višekomponentna fizička aktivnost koja obuhvata funkcionalnu ravnotežu i trening snage umerenog ili visokog intenziteta najmanje 3 dana u nedelji (World Health Organization, 2020).

Rezultati naučnih istraživanja su takođe dokazali da 500 MET minuta nedeljno aerobne fizičke aktivnosti, što je ekvivalentno 150 minuta umerenog intenziteta ili 75 minuta visokog intenziteta fizičke aktivnosti nedeljno, dovelo do značajnog smanjenja rizika od smrtnosti od svih uzroka kod pacijenata sa kardiovaskularnim oboljenjima, kao i smanjenje rizika od kardiovaskularnih oboljenja kod zdravih odraslih osoba (Jeong et al., 2019). Deca i adolescenti uzrasta 5-17 godina koji su u proseku upražnjavali 60 minuta fizičke aktivnosti umerenog do visokog intenziteta dnevno, imali su mnogobrojne povoljne zdravstvene benefite uključujući poboljšanje emocionalne regulacije, poboljšanje kognitivnih sposobnosti, smanjenu incidencu depresije, anksioznosti, efikasniju kardiorespiratornu izdržljivost, povećanu mišićnu snagu i izdržljivost, adekvatnu mineralizaciju kostiju, smanjenu incidencu za razvoj autoimunih bolesti, kao i adekvatno funkcionisanje metaboličkog sistema (Chaput et al., 2020). Zato je usvojena preporuka da deca i adolescenti uzrasta 5-17 godina upražnjavaju 60min fizičke aktivnosti umerenog do visokog intenziteta dnevno (World Health Organization, 2020).

Može se zaključiti da je uz adekvatno programiranje, redovna fizička aktivnost efikasan način za poboljšanje fizičkih performansi, poboljšanje fizičkog i mentalnog zdravlja i smanjenje faktora rizika za veliki broj hroničnih nezaraznih bolesti kao što su depresija, anksioznost, kardiovaskularne bolesti, metabolički sindrom, sarkopenija, osteoporoza, respiratorne bolesti i drugo. Za razliku od lekova, fizička aktivnost nema negativnih nuspojava, zanemarljivo košta i istovremeno ispoljava pozitivne efekte na mnoge zdravstvene probleme. Ako bi se mnoštvo korisnih efekata redovnog vežbanja kombinovalo u jednom leku, on bi se prepisivao za skoro sve vrste fizičkih i mentalnih zdravstvenih problema.

1.4.3. Metode za procenu intenziteta fizičke aktivnosti

Dozno-zavisni efekat fizičke aktivnosti je tema koja je zaokupirala pažnju mnogobrojnih naučnih studija. Potvrđeno je da umerena fizička aktivnost ima veliki broj zdravstvenih benefita, a da visoko intenzivna fizička aktivnost može imati čak i negativne efekte po zdravlje (La Gerche and Heidbuchel, 2014; O'Keefe et al., 2020). Sposobnost procene uticaja različitog intenziteta fizičke aktivnosti na zdravlje zavisi od metoda pomoću kojih je moguće tačno, precizno i ponovljivo odrediti intenzitet FA.

Metode merenja su značajno evoluirale tokom godina, stvarajući heterogen skup dokaza koji podržavaju tvrdnju da fizička aktivnost ima povoljne uticaje na zdravlje (Xiao, 2020).

Kompleksnost procene je otežana različitim zdravstvenim implikacijama merenja aktivnosti, različitim metodama merenja intenziteta i procenom doprinosa fizičke aktivnosti. Zbog svega navedenog, upotreba validne, precizne i pouzdane metode u istraživanjima o uticajima fizičke aktivnosti predstavlja neprekidan izazov, budući da je od suštinske važnosti da se odabere metoda koja može pružiti relevantne odgovore na hipoteze i dizajn studije, pružajući istovremeno korisne rezultate.

Intenzitet FA se može proceniti u apsolutnim vrednostima kao ukupan rezultat date aktivnosti ili u relativnim vrednostima kao procenat određenih maksimalnih fizioloških parametara (Wasfy and Baggish, 2016). Apsolutni intenzitet vežbanja se obično meri u metaboličkim ekvivalentima (MET) ili u kilokalorijama (kcal) sagorelim po jedinici vremena (tabela 2). Koristeći standardizovane procene potrošnje MET ili kcal, ovi rezultati apsolutnog intenziteta su adekvatni za procenu intenziteta fizičke aktivnosti u populacijama kao što su adolescenti i deca, kao i odrasli između 18 i 65 godina, i stoga se obično koriste u opservacionim studijama koje procenjuju uticaj intenziteta FA na pojedine komponente zdravlja. Ograničenje rezultata apsolutnog intenziteta je njihova neefikasnost da uzmu u obzir veliku varijabilnost u fizičkoj spremnosti koja može postojati između opserviranih ispitanika. Na primer, vežbanje intenziteta od 5 MET može istovremeno predstavljati visoki intenzitet FA za ispitanika sa uznapredovalom kardiovaskularnom bolešću i relativno nizak do umeren napor za univerzitetske sportiste (Wasfy and Baggish, 2016).

Najčešće korišćena metoda za procenu apsolutnih vrednosti FA su upitnici za samoprocenu, koji se oslanjaju na sposobnost prisećanja ispitanika. Glavne razlike među upitnicima se ogledaju u tome koje sve elemente FA mere (npr. oblik, trajanje ili učestalost fizičke aktivnosti), kvalitet podataka (npr. mere intenziteta, razlikovanje uobičajenih FA i samo nedavne aktivnosti i uključivanje aktivnosti u slobodno vreme i aktivnosti koje nisu u slobodno vreme), način na koji se podaci izveštavaju (npr. kilokalorije, rezultati aktivnosti, vreme) i kako se dobijaju podaci (npr. kompjuterizovani upitnik, intervju, odgovaranje na pitanja na papiru) (Besson et al., 2010). Prednost upitnika uključuju lakoću administracije, ekonomičnost, preciznost u merenju intenzivne FA, kao i sposobnost da se odrede diskretne kategorije nivoa aktivnosti (npr. nizak, umeren ili visok), rangiranja pojedinaca ili grupa prema njihovoj fizičkoj aktivnosti, pružaju detalje o fizičkoj aktivnosti i pokazuju poboljšanje među grupama ili pojedincima (Sylvia et al., 2014). Zbog mogućnosti poređenja, upitnici za samoprocenu su značajno pouzdaniji na nivou grupe nego na individualnom nivou, kao i kada je upitnik strukturiran hronološki i sa definisanim periodima (Sylvia et al., 2014).

Tabela 2. Kvantifikacija apsolutnog intenziteta FA (prevedeno i preuzeto od Wasfy and Baggish, 2016)

Jedinica intenziteta i definicija	Raspon intenziteta	Prednosti (+) Mane (-)	Procena intenziteta FA
Apsolutni intenzitet: energija potrebna za obavljanje aktivnosti			
<p>Kilokalorije/vreme</p> <p>Potrošnja 1 L O₂=5kcal</p>	Nije definisano	<p>(+) Povezan sa unosom energije</p> <p>(-) Zavisí od telesne mase</p> <p>(-) Nepraktično za direktno merenje</p> <p>(-) Nije individualizovan na osnovu kondicije</p>	Potrošnja kcal/nedeljno
<p>Metabolički ekvivalent (MET)</p> <p>1 MET= 3,5mL potrošnje O₂/kg/min = mirno sedenje</p>	<p>Sedentarni: 1-1,5 MET</p> <p>Niski: 1,6-2,9MET</p> <p>Umereni: 3,0-5,9MET</p> <p>Visoki: >6,0MET</p>	<p>(+) Intenzitet aktivnosti se može izraziti jednostavno kao kumulativan zbir potrošnje energije u odnosu na mirovanje</p> <p>(-) MET procene za datu aktivnost variraju u zavisnosti od telesne konstitucije, pola i starosti</p> <p>(-) Nije individualizovan na osnovu fizičke spremnosti</p>	<p>Ukupno MET.min.ned⁻¹</p> <p>Ukupno MET.h.ned⁻¹</p>

Za razliku od procene intenziteta fizičke aktivnosti u apsolutnim vrednostima, procena intenziteta fizičke aktivnosti u relativnim vrednostima uzima u obzir razlike u individualnim nivoima tako što definiše intenzitet kao procenat određenih maksimalnih fizioloških parametara (tj. maksimalne potrošnje kiseonika-VO₂max, procenat rezerve srčane frekvencije-HRR, maksimalna srčana frekvencija-HRmax, korišćenje Borgove skale subjektivnog osećaja zamora). Samim tim, procena relativnog intenziteta se odnosi na fizičku aktivnost gde se nivo napora određuje na osnovu trenutnog nivoa napora u odnosu na maksimalni kapacitet (tabela 3) (Siddique et al., 2020). Kao primer, može se kategorisati vežbanje koje se izvodi pri relativnom intenzitetu fizičke aktivnosti od 60% maksimalne potrošnje kiseonika (VO₂ max) može se dozirati kao hodanje na tredmilu brzinom od 5km na sat za ispitanika koji ima pozitivnu anamnezu za kardiovaskularne bolesti, i trčanje na tredmilu brzinom od 10km na sat za sportistu takmičara. Upotreba relativnog intenziteta fizičke aktivnosti je uobičajena u kliničkoj praksi za sastavljanje predloga i preporuka za vežbanje i u visokokvalitetnim interventnim studijama vežbanja. Za efikasnu primenu ove metode određivanja intenziteta FA neophodno je tačno određivanje maksimalnih vrednosti za svakog pojedinačnog subjekta, što zahteva specifičan oblik laboratorijske ili terenske procene intenziteta FA. Ovaj proces, kada se primjenjuje u svrhu naučnih studija, zahteva značajan angažman resursa i predstavlja izuzetno zahtevno izvođenje.

Tabela 3. Kvantifikacija relativnog intenziteta FA (prevedeno i preuzeto od Wasfy and Baggish, 2016)

Jedinica intenziteta i definicija	Raspon intenziteta	Prednosti (+) Mane (-)	Procena intenziteta FA
Relativni intenzitet: procenat maksimalnog kapaciteta FA			
% maksimalne potrošnje kiseonika (VO ₂ max)	Veoma lagan: <25%	(+) Određeno u odnosu na fizičku spremnost pojedinca	Ukupno minuta/sati u zoni datog intenziteta
	Lagan: 25-44%	(-) Zahteva prethodno laboratorijsko testiranje	
	Umeren: 45-59%	(-) Nepraktično za merenje tokom uobičajene FA	
	Visok: 60-84%		
	Veoma visok: 85-99%		
Maksimalni: 100%			

<p>% maksimalne srčane frekvencije (HRmax%)</p>	<p>Veoma lagan: < 30%</p> <p>Lagan: 30-49%</p> <p>Umeren: 50-69%</p> <p>Visok: 70-89%</p> <p>Veoma visok: 90-99%</p> <p>Maksimalni: 100%</p>	<p>(+) Procenjuje fizičku spremnost pojedinca</p> <p>(+) Lako se prati tokom uobičajenih FA pomoću monitora srčane frekvencije</p> <p>(+) Dobra korelacija sa potrošnjom energije tokom FA u stabilnom stanju umerenog-visokog intenziteta</p> <p>(-) Zahteva prethodno laboratorijsko testiranje</p>	<p>Ukupno minuta/sati u zoni datog intenziteta</p>
<p>Borgova skala subjektivnog osećaja zamora (modifikovana)</p>	<p>Veoma lagan: <10</p> <p>Lagan: 10-11</p> <p>Umeren: 12-13</p> <p>Visok: 14-16</p> <p>Veoma visok: 17-19</p> <p>Maksimalni: 20</p>	<p>(+) Procenjuje fizičku spremnost pojedinca</p> <p>(+) Lako se procenjuje tokom vežbanja</p> <p>(-) Velike varijacije među pojedincima čak i na sličnim nivoima fizičke spremnosti</p>	<p>Ukupno minuta/sati u zoni datog intenziteta</p>

Metoda dvostruko obeležene vode gde subjekti unose izotopske markere kiseonika i vodonika, koji kada se eliminišu iz tela urinom dozvoljavaju određivanje ukupne proizvodnje ugljen-dioksida i potrošnje energije, ostaje zlatni standard za procenu ukupne potrošnje energije i intenziteta fizičke aktivnosti. Međutim, ova metoda se ne koristi često za istraživačke studije jer je skupa, zahteva veliko opterećenje ispitanika, dugotrajan je proces i ne može da obuhvati kvalitativne podatke (Westerterp, 2017).

Veliki broj opservacionih kohortnih studija, kao i velikih prospektivnih opservacionih studija su često procenjivale intenzitet FA na apsolutnoj skali (Bonney et al., 2001; Lee et al., 1995; Piercy et al., 2018). Da bi se obezbedila zajednička analiza rezultata koja bi omogućila poređenja između studija o fizičkoj aktivnosti iz instrumenata za samoprocenu između različitih upitnika, razvijen je tkz. "zbornik fizičkih aktivnosti", koji procenjuje energiju potrebnu za obavljanje bilo koje date aktivnosti kroz metaboličke ekvivalente (MET) (Ainsworth et al., 2011). Izražavanje intenziteta FA kroz MET sate ili MET minute je široko prihvaćen način procene nivoa intenziteta FA koji omogućava poređenje svih metoda merenja fizičke aktivnosti. Najvažnije, za odrasle uzrasta od 18 do 65 godine, preporuke za upražnjavanje FA su zasnovane na skali apsolutnog intenziteta i izvedene su na osnovu istraživanja koje su procenjivale odnos doza-odgovor između potrošnje energije (tj. apsolutnog intenziteta) i zdravlja (Piercy et al., 2018).

Zbog prethodno navedenih dokaza izvedenih iz naučnih studija odlučili smo se da u našoj studiji procenjujemo apsolutni intenzitet fizičke aktivnosti na osnovu upitnika za samoprocenu, i na taj način utvrdimo da li različiti nivoi intenziteta FA imaju uticaja kako na imuni sistem, posebno na strukturne promene hromatina neutrofilnih granulocita, tako i na ispitivane parametre mentalnog distresa.

1.4.4. Fizička aktivnost kao modulišući faktor funkcije neutrofila

Efekat fizičke aktivnosti na fiziološko funkcionisanje imunskog sistema je dobro poznat. FA i imunski odgovor su međusobno povezani i utiču jedno na drugo. FA menja imunološku regulaciju utičući na leukocite, NK ćelije, interleukine, citokine, T i B limfocite (Gupta et al., 2018). Redovna FA doprinosi smanjenju rizika od hroničnih metaboličkih i kardiorespiratornih bolesti, delimično zbog antiinflamatornih efekata FA (Wedell-Neergaard et al., 2018). Sa druge strane ovi efekti su verovatno odgovorni i za suzbijanje fizioloških funkcija imuniteta koji naše telo čini podložnijim infekcijama (Asimakos et al., 2018).

Složena mreža ćelija i molekula gradi imuni sistem, koji funkcioniše tako da štiti naše telo od invazije mikroorganizama, olakšava zarastanje rana i sprečava bolest. Imuni sistem se može podeliti na urođeni (nespecifičan, prirodan) i adaptivni (specifični, ponavljajući) imunitet, a oba imunska sistema funkcionišu sinergistički u ukupnom imunološkom odgovoru.

U imunološkom odgovoru, ćelije adaptivnog imunskog sistema imaju ulogu da oslobađaju molekule glasnika i citokine koji moduliraju imuni odgovor, posebno funkciju urođenih imunih ćelija, dok ćelije urođenog imunog sistema pomažu funkcionisanje specifičnih imunih odgovora kroz prezentaciju antigena (Iwasaki and Medzhitov, 2015). Imuni sistem ne samo da štiti naše telo od infekcije, već utiče i na druge fiziološke sisteme i njihove procese, uključujući metabolizam, san, reparaciju tkiva, mentalno zdravlje i termoregulaciju (Sattler, 2017). Na osnovu dokaza da reakcije na stres posredovane preko endokrinog i nervnog sistema igraju ključnu ulogu u određivanju imunih promena izazvanih fizičkom aktivnošću i da imuni sistem posreduje u mnogim efektima FA, poslednjih godina imunologija vežbanja se razvila u posebnu naučnu disciplinu (Peake, 2013).

Postoje relevantni naučni dokazi da FA umerenog intenziteta ispoljava pozitivne efekte na organizam, dok produženi periodi intenzivne FA mogu smanjiti imunitet (Asimakos et al., 2018). Imuni odgovor na dejstvo FA je precizno usklađen, a specifične imune ćelije se redistribuiraju za definisane funkcionalne svrhe. Većina naučnih studija o efektima FA na imuni sistem fokusirana je na uticaj hroničnih efekata FA. Dokazano je da intenzitet, trajanje i obim FA utiču na redistribuciju imunih ćelija u cirkulaciju povezanu sa FA (Bigley and Simpson, 2015; Walsh et al., 2011). I akutna i hronična FA su pokazale značajan uticaj na aktivnost, redistribucije i funkciju neutrofila.

Neutrofili, kao ćelije koje prve reaguju u borbi protiv bakterijske infekcije u urođenom imunitetu, su pogodan tip ćelija za proučavanje u oblasti imunologije vežbanja. Paradoksalna funkcija neutrofila je da iako su ove ćelije neophodne za odbranu domaćina, one su takođe uključene u patološki supstrat inflamatornih stanja (Euler and Hoffmann, 2019). Njihova mikrobicidna aktivnost se sastoji od oksidativnih i neoksidativnih procesa koji se aktiviraju istovremeno nakon fagocitoze. Dok se uništavanje infektivnih agenasa dešava intracelularno, oslobađanje citotoksičnih molekula u ekstracelularni odeljak može oštetiti tkiva. Aktivnosti neutrofila su modulirane citokinima, hormonima i bioaktivnim lipidima. Stoga je još uvek neizvesno da li promene u funkciji neutrofila izazvane FA imaju pozitivne ili negativne posledice po ukupno zdravlje.

Akutna FA visokog intenziteta izaziva intenzivne promene u broju i funkciji neutrofila u krvi. Neutrofili, kao i sve druge glavne subpopulacije leukocita imaju tendenciju povećanja broja tokom intenzivne FA kao rezultat hemodinamskog stresa i oslobađanja kateholamina i kortizola koji deluju na β 2-adrenergičke i glukokortikoidne receptore neutrofila (Walsh et al., 2011). Ovo se dešava kada intenzitet FA pređe 60% V_{O_2max} . Međutim, ovaj prag može biti znatno niži ako postoji dugotrajno opterećenje naporom. Mobilizacija u cirkulaciju ne samo neutrofila, već svih klasa leukocita je otpočeta visoko intenzivnom FA i kod sportista i kod neaktivnih pojedinaca, dok hronični ponovljeni efekti submaksimalnog intenziteta FA pojačavaju mobilizaciju neutrofila na račun limfocita (Syu et al., 2012). Akutna visoko intenzivna FA, poput trčanja maratona ili visoko intenzivnog intervalnog vežbanja, povećava oštećenje tkiva i stimuliše lučenje mnogih

proinflammatory citokina (faktor nekroze tumora alfa- TNF α i interleukina 1 β) koji izazivaju povećanje broja neutrofila, a takođe se povećava rizik od infekcije gornjih respiratornih puteva (Simpson et al., 2020).

Broj neutrofila (i shodno tome, ukupan broj leukocita) često nastavlja da raste dugo tokom perioda oporavka (do 6 h nakon prestanka vežbanja), posebno ako je vežba produžena (>2 h) (Syu et al., 2012). Ovu „neutrofiliju“ karakteriše povećano prisustvo nezrelih, manje diferenciranih, prekursora neutrofila u krvi, najverovatnije kao odgovor na povećane nivoe biomarkera u plazmi uključujući glukokortikoide, hormon rasta i citokine kao što je IL-6 i faktor stimulacije kolonije granulocita, koji mobilizuju mijeloidne ćelije iz koštane srži. Zbog toga, iako postoji povećan broj neutrofila, njihova ukupna funkcija je smanjena (Peake et al., 2004). Iako je ova neutrofilija posle dužeg vežbanja slična onoj uočenoj tokom bakterijske infekcije (>10,0 \times 10⁶/ml), 6-24 h oporavka je obično dovoljno da se broj neutrofila vrati u fiziološke vrednosti (Peake et al., 2017).

Za razliku od visoko intenzivne, akutne FA, prolongirana i kontinuirana FA umerenog intenziteta ne menja broj neutrofila u krvi, a značajno poboljšava skoro sve elemente neutrofilne funkcije (Wang et al., 2020). Kontinuirana i redovna aerobna fizička aktivnost umerenog intenziteta povećava sposobnost hemotakse kao i fagocitoze neutrofilnih granulocita (Nieman and Wentz, 2019). Hormoni stresa, adrenalin i noradrenalin, koji mogu da smanje funkciju imunih ćelija, i proinflammatory citokini, koji ukazuju na intenzivnu metaboličku aktivnost, ne dostižu visoke nivoe za vreme umerene fizičke aktivnosti koja traje kraće od 60 minuta. Hronična umereno intenzivna FA snižava mnoge proinflammatory citokine (npr. C-reaktivni protein i IL-1) i povećava koncentraciju antiinflammatory citokina (IL-10) u cirkulaciji, i na taj način održava nivoe neutrofila u fiziološkim granicama i značajno poboljšava imunitet na šta ukazuje smanjena osetljivost na virusne i bakterijske infekcije (Wang et al., 2020). Tokom aerobne fizičke aktivnosti umerenog intenziteta koja traje kraće od 60 minuta, povećava se ukupna antipatogena aktivnost ne samo neutrofilnih granulocita, već i tkivnih makrofaga paralelno sa pojačanom recirkulacijom imunoglobulina, citokina, NK ćelija, citotoksičnih T ćelija i nezrelih B ćelija, koje igraju kritičnu ulogu u aktivnosti imunološke odbrane (Nieman and Wentz, 2019).

Teško je proceniti sve efekte različitog intenziteta FA na imunski sistem. Takođe ostaje izazov da se otkrije efekat moguće imunosupresije ili čak imunoprogresije izazvane uticajem drugih faktora koji povećavaju osetljivost pojedinca na mikroorganizme, kao što je mentalni distres, poremećaji sna, poremećaji u ishrani i redukcija esencijalnih hranljivih materija. Zbog velikog broja faktora koji moduliraju odgovor imunskog sistema na FA, ostaje upitna izolovana procena adekvatne uzročno-posledične veze između FA aktivnosti i funkcionisanja imunskog sistema, i naša studija je pokušala da doprinos istraživanju u ovoj oblasti.

1.4.5. Međusobna povezanost fizičke aktivnosti i mentalnog distresa

Danas, veliki broj istraživanja podržava benefite FA na fizičko zdravlje, i empirijski zasnovane karakteristike aktivnosti su uspostavljene za prevenciju i terapiju velikog broja poremećaja fizičkog zdravlja tokom životnog veka. Međutim, prednosti FA nisu ograničene samo na komponente fizičkog zdravlja, kao i stanje bolesti. Fizička aktivnost je takođe promovisana kao sredstvo za unapređenje različitih komponenti mentalnog zdravlja, uključujući emocionalne poremećaje, stres, depresiju, anksioznost, poboljšanje i očuvanje svih segmenata kognitivnih funkcija (White et al., 2017).

Mentalni distres je globalni problem koji pogađa milione ljudi širom sveta. Stres, depresija, anksioznost, umor, nesаница, poremećaj kognitivnih funkcija, emocionalni poremećaji su komponente poremećaja mentalnog zdravlja. Studije su uporedile očekivane zdravstveno povoljne efekte redovne fizičke aktivnosti za poboljšanje mentalnog zdravlja sa drugim terapijama, na primer, lekovima. Najnovija istraživanja pokazuju da fizička aktivnost i vežbanje koje se koriste kao primarni ili sekundarni metod terapije imaju značajne pozitivne efekte u prevenciji ili ublažavanju simptoma depresije i imaju antidepresivni efekat kod osoba sa neurološkim oboljenjima (Adamson et al., 2015; Kim et al., 2019). FA i vežbanje poboljšavaju kvalitet života i suočavanje sa stresom i jačaju sposobnost emocionalne regulacije, samopoštovanja i socijalnih veština, a takođe smanjuju i minimiziraju simptome anksioznosti i stresa (Kandola and Stubbs, 2020; Wu et al., 2022; Faílde-Garrido et al., 2022)

Meta- analiza koju su Pearce i saradnici publikovali, a koja je obuhvatila više od 190 hiljada ispitanika, je uočila da postoji značajna dozno-zavisna veza između FA i depresije. Dokazano je da u odnosu na ispitanike koji ne upražnjavaju FA, oni koji upražnjavaju FA polovinu preporučenog nedeljnog obima 4,4 MET sati nedeljno (METh/ nedelja) imaju 18% manji rizik od pojave depresije. Ispitanici koji su upražnjavali preporučen obim FA od 8,8 MET sati nedeljno imali su čak 25% manji rizik incidence depresije (Pearce et al., 2022). Studija je pokazala da veći intenzitet FA nije doprineo povećanju zdravstveno povoljnih efekata FA.

Pronađeni su i mnogobrojni dokazi o zaštitnim efektima fizičke aktivnosti u lečenju i minimiziranju simptoma anksioznosti. Schuch i saradnici su u meta-analizu uključili preko 69.000 učesnika, i dokazali da viši nivoi fizičke aktivnosti značajno smanjuju incidencu anksioznog napada (Schuch et al., 2019).

Neka od predloženih fizioloških objašnjenja za poboljšanje mentalnog zdravlja primenom fizičke aktivnosti i vežbanja su veća perfuzija i povećan volumen mozga, povećan volumen hipokampusa, antiinflamatorni efekti fizičke aktivnosti koji značajno smanjenju inflamaciju mozga kod mentalnih i neuroloških bolesti (Schuch and Vancampfort, 2021; Spielman et al., 2016).

Fizička aktivnost takođe može da posreduje u otpornosti na depresiju izazvanu stresom preko receptora gama koaktivatora 1-alfa (PGC-1 α) aktiviranog proliferatorom skeletnih mišića peroksizoma, povećavajući konverziju kinurenina u kinurenin kiselinu, što zauzvrat štiti mozak i smanjuje rizik od stresom izazvane depresije (Agudelo et al., 2014). Dalje, povećano oslobađanje faktora rasta, endorfina i signalnih molekula su drugi amplifikatori mentalnog zdravlja izazvani vežbanjem (Knochel et al., 2012).

Dokazano je da FA značajno povećava aktivnost neurotrofnog faktora iz mozga (*engl. Brain-Derived Neurotrophic Factor-BDNF*). Nedostaci u BDNF signalizaciji, malom molekulu kojeg proizvode i luče neuroni, doprinose patogenezi nekoliko najčešćih i najznačajnijih mentalnih bolesti, kao što su depresija, anksiozni poremećaji, šizofrenija i bipolarni poremećaji (Phillips, 2017). Fizička aktivnost je posebno efikasna strategija za povećanje nivoa BDNF u cirkulaciji i poboljšanje funkcije mozga (Colucci-D'Amato et al., 2020). Takođe, čini se da fiziološki stres, delimično modulisan hipotalamuso-hipofizno-nadbubrežnom osovinom (HHN), igra centralnu ulogu u nizu psihijatrijskih stanja uključujući anksioznost i poremećaje povezane sa stresom. Vežba utiče na stres i HHN osovinu, što može doprineti njegovom anksiolitičkom efektu (Abelson et al., 2007).

Pošto neuroni i leukociti infiltriraju svako tkivo u telu, nervni i imuni sistem mogu igrati posebno važnu ulogu u koordinaciji odgovora na FA i u svim pozitivnim efektima na zdravlje koje različiti modaliteti FA pružaju. Navodno je dokazano da FA može ublažiti negativne efekte mentalnog distresa, kao i poboljšati funkciju imunog sistema (Hawley et al., 2014). Kompleksne neuronske mreže kontrolišu inicijaciju, intenzitet, trajanje i završetak FA, kao i odgovore svih sistema organa na FA. Međutim, mehanizmi pomoću kojih nervni sistem može poboljšati funkcionalnost i otpornost na bolesti različitih sistema organa uglavnom su nepoznati. Takođe, potrebne su i dalje naučne studije kako bi se razgraničila uloga FA u regulisanju inflamacije i poboljšanju određenih komponenti imunološke funkcije.

Precizno definisanje na koji način FA moduliše aktivnost nervnih i imunih ćelija može otkriti nove pristupe za smanjenje negativnih uticaja ovih poremećaja po zdravlje, i naša studija je po našim saznanjima prva koja će pokušati da objasni kompleksu integraciju strukturnih promena neutrofilnih granulocita koje mogu biti posledica međusobne kooperacije mentalnog distresa i promenljivog intenziteta FA u populaciji sportista.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja:

1. Ispitati da li postoji statistički značajna korelacija između teksturalnih parametara strukture i distribucije hromatina neutrofilnih granulocita periferne krvi i nivoa mentalnog distresa kod sportista
2. Ispitati da li intenzitet fizičke aktivnosti sportista statistički značajno utiče na povezanost strukture hromatina neutrofilnih granulocita periferne krvi i nivoa mentalnog distresa kod sportista
3. Predložiti model zasnovan na metodama veštačke inteligencije i mašinskog učenja koji bi mogao da na osnovu parametara strukturne organizacije hromatina neutrofilnih granulocita periferne krvi utvrdi postojanje mentalnog distresa kod sportista

3. MATERIJAL I METODOLOGIJA

Period istraživanja je planiran i sproveden u toku drugog dela 2021. godine. Sva merenja i analize su obavljene u Laboratoriji za medicinu sporta i terapiju vežbanjem, kao i u Laboratoriji za celularnu fiziologiju, Instituta za medicinsku fiziologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Pre uključivanja u istraživanje, svi ispitanici su u pisanoj formi bili detaljno informisani o samom cilju, svrsi i načinu na koji će istraživanje biti sprovedeno, kao i o svim potencijalnim rizicima. Nakon detaljnog informisanja, od svakog pojedinačnog ispitanika koji je bio spreman da učestvuje u studiji je dobijen pismeni, dobrovoljni pristanak. Istraživanje je dobilo dozvolu Etičke komisije Medicinskog fakulteta u Beogradu, broj 1322/VII-17, i sprovedeno je u skladu sa Etičkim kodeksom i principima Internacionalnog medicinskog udruženja (Deklaracija iz Helsinkija) za istraživanja na humanoj populaciji, uključujući istraživanja na humanom materijalu.

3.1. Izbor ispitanika i kriterijumi za podelu na grupe u istraživanju

Studija preseka je obavljena na uzorku od 100 zdravih sportista, studenata Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, koji su se takmičili u Univerzitetskoj ligi. U studiji je učestvovalo 60 ispitanika muškog pola i 40 ispitanica ženskog pola, prosečne starosti 22.8 ± 2.2 godina. Ispitanici su podeljeni na dve grupe od interesa na osnovu rezultata dobijenih popunjavanjem upitnika.

Prvi kriterijum za podelu ispitanika je izvršen prema rezultatima dobijenih analizom strukturisanog, validiranog upitnika o proceni mentalnog distresa (Lovibond and Lovibond, 1995; Jovanovic et al., 2014; Spitzer et al., 2006; Rokvic, 2019; Gross and John, 2003; Popov et al., 2016). Dobijeni rezultati su nam poslužili da na osnovu nivoa mentalnog distresa podelimo ispitanike na dve grupe. Prva grupa ispitanika je imala fiziološki nivo mentalnog distresa, i u toj grupi je bilo ukupno 42 ispitanika. Druga grupa ispitanika je imala povišen nivo mentalnog distresa, i u toj grupi je bilo 58 ispitanika.

Drugi kriterijum koji je bio uzet za klasifikaciju ispitanika na grupe je procena intenziteta fizičke aktivnosti na osnovu rezultata dobijenih analizom Međunarodnog upitnika fizičke aktivnosti (*International Physical Activity Questionnaire - IPAQ*) (The IPAQ Group, 2015; IPAQ Research Committee, 2005). Obradom odgovora iz upitnika, ispitanici su podeljeni u dve grupe prema intenzitetu fizičke aktivnosti: ispitanici sa umerenim i visokim intenzitetom fizičke aktivnosti. U grupi umerenog intenziteta je bilo 38 ispitanika, a u grupi visokog intenziteta fizičke aktivnosti je bilo 62 ispitanika.

Pre započinjanja studije, svi ispitanici su popunjavali standardizovani sportsko-medicinski upitnik koji se sastojao od 48 pitanja na koja je ispitanik mogao odgovoriti sa da ili ne.

Pitanja u upitniku su se pre svega odnosila na sportsku anamnezu, zatim medicinsku anamnezu koja je obuhvatala ličnu, porodičnu, kao i anamnezu po sistemima organa. Svaki pojedinačni odgovor koji je označen kao potvrđan je na kraju upitnika bio detaljno obrazložen. Na samom kraju upitnika svi ispitanici su svojeručnim potpisom potvrđivali tačnost i verodostojnost datih podataka. Popunjen, a zatim detaljno pregledan upitnik je poslužio kao jedan od kriterijuma za definitivni izbor svih prijavljenih ispitanika u studiji.

Inkluzioni kriterijumi za učešće u studiji su bili: obavezan status studenta Medicinskog fakulteta, članstvo u Univerzitetnoj sportskoj ligi, učestalost treninga minimum tri puta nedeljno, učešće na sportskim utakmicama, intenzitet fizičke aktivnosti od najmanje 150 minuta umerene ili 75 minuta intenzivne fizičke aktivnosti nedeljno. Ekskluzioni kriterijumi su bili: medicinska istorija mentalnih poremećaja, pozitivna porodična anamneza mentalnih poremećaja, medicinska istorija hroničnih nezaraznih sistemskih bolesti poput hipertenzije, dijabetesa, autoimunih bolesti, upotreba alkohola, psihoaktivnih supstanci lekova i drugih sredstava koji mogu da utiču na centralni nervni sistem poput anksiolitika i antidepresiva, kao i niske ili povišene vrednosti neutrofilnih granulocita (<40%; >70% u relativnoj leukocitarnoj formuli).

3.2. Protokol prikupljanja podataka

Sve analize, merenja i ispitivanja su izvođena u prostorijama Laboratorije za medicinu sporta i terapije vežbanjem, kao i Laboratorije za celularnu fiziologiju Instituta za medicinsku fiziologiju, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Merenja su se vršila u prepodnevnom časovima, između 8:00 i 12:00 časova. Na ovaj način je uticaj homeostaskog cirkadijalnog ritma na parametre od značaja bio minimalan. Sva merenja su uvek bila sprovedena u strogo kontrolisanim ambijentalnim uslovima: temperatura je odgovarala zoni komfora i bila je između 18 i 22 °C, atmosferski pritisak je iznosio 760 mmHg a relativna vlažnosti vazduha je bila maksimalno do 60% (iznosila je između 30 i 60%). Sve analize, merenja i preglede je isključivo izvodio jedan istraživač, uvek na identičan način i pod identičnim uslovima.

3.2.1 Antropometrijska merenja ispitanika

Za metodologiju procene telesne visine ispitanika (TV) su korišćene smernice iz Internacionalnog biološkog programa (*IBP- International Biological Programme*), u kojem je jasno definisana standardizovana lista antropometrijskih mera koje se određuju prema uniformnoj proceduri (Weiner and Lourie, 1981). Prema ovoj metodologiji tokom merenja TV svi ispitanici su zauzimali jasno definisan položaj tela: ispružen, sastavljene i jednako opterećene noge, sastavljene pete, stopala su u odnosu na pete bila u divergentnom položaju pod uglom od 60 stepeni, ruke su stajale uz telo, a glava je bila u uspravnom položaju (nivo Frankfurtske horizontale).

Za proceduru merenja TV koristili smo standardni laboratorijski visinometer (*Seca 214 Portable Stadiometer, Cardinal Health, USA*). Ovaj visinomer predstavlja 210cm dugačku graduisanu, mernu šipku ugaonog profila sa pokretnim delom koji klizi celom dužinom visinomera. Pokretni deo predstavlja horizontalni klizač koji se prilikom merenja prislanja na jasno definisanu antropometrijsku tačku na temenu - *vertex* ispitanika. Vrednosti TV se nakon merenja direktno očitavaju na otvoru horizontalnog mernog klizača. Merna skala je štampana duž bočne strane merne šipke, što omogućava lako očitavanje rezultata prilikom merenja, čime se garantuju precizni rezultati. Izmerene vrednosti telesne visine su prema matematičkom pravilu zaokruživanja decimalnih brojeva, zaokruživane na najbližu vrednost, sa greškom od ± 0.5 cm.

Za procenu telesna mase ispitanika (TM), za određivanje procenta telesnih masti (BF%), kao i za određivanje mase mišićnog tkiva korišćena je metoda bioimpedance (*InBody 230 Body Composition Analyzer, Seoul, Korea*). Metodologija merenja prethodno opisanih parametara je zahtevala sledeću proceduru: ispitanik je morao da stane bos na za to određena mesta na vagi i da u istom trenutku obuhvati levom i desnom šakom elektrode koje su za to predviđene. Nakon unošenja relevantnih podataka o visini, uzrastu i polu svakog ispitanika proces merenja je mogao da započne. Rezultati merenja dobijani su u štampanoj formi na standardizovanom formularu proizvođača.

3.2.2. Fizikalni pregled ispitanika

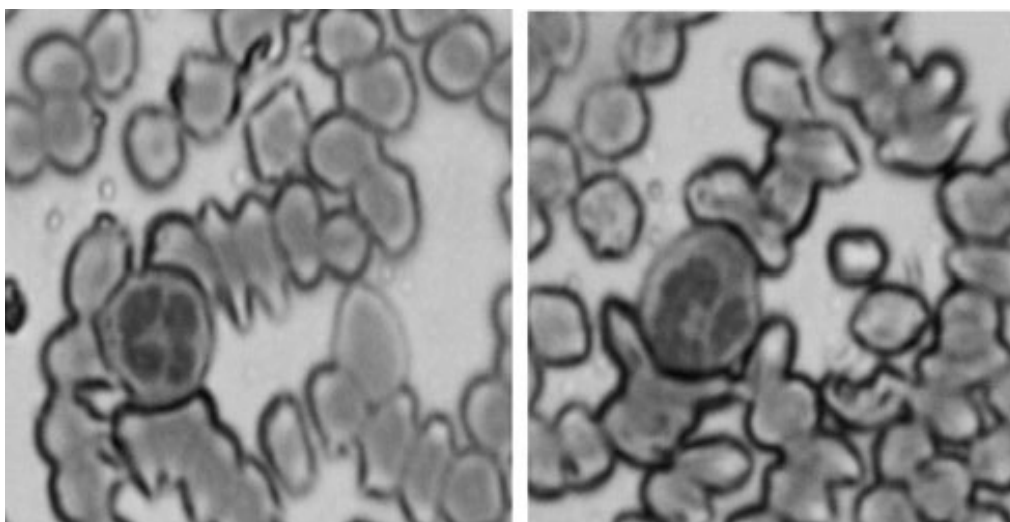
Na početku fizikalnog pregleda svim ispitanicima je urađen elektrokardiografski zapis u miru, nakon 3 minuta mirovanja u ležećem položaju, koristeći dvanaestokanalni elektrokardiograf (*Cardioline Delta 3 Plus Digital ECG Machine, Italia*), standardne brzine kretanja trake od 25 mm/s, da bi se iz istraživanja isključili svi ispitanici kojima su utvrđene signifikantne promene na EKG zapisu. Metodom po Korotkovu svim ispitanicima su određivane vrednosti arterijskog krvnog pritiska, postavljanjem donje ivice manžetne 2cm iznad nivoa brahijalne arterije obostrano, korišćenjem sfingomanometra (*GIMA S.p.a. Gessate, Italy*) (Samokhvalov et al., 2016). Za potrebe istraživanja uvek su se uzimale veće vrednosti arterijskog krvnog pritiska. Zatim su svi ispitanici bili podvrgnuti kompletnom fizikalnom pregledu po sistemima organa (glava, vrat, grudni koš, abdomen i ekstremiteti) metodama inspekcije, perkusije, palpacije i auskultacije. Metodologija fizikalnog pregleda je obavljena prema standardizovanoj proceduri (Lyle et al., 2012).

3.3. Gray Level Co-occurrence Matrix (GLCM) algoritam teksturalne analize

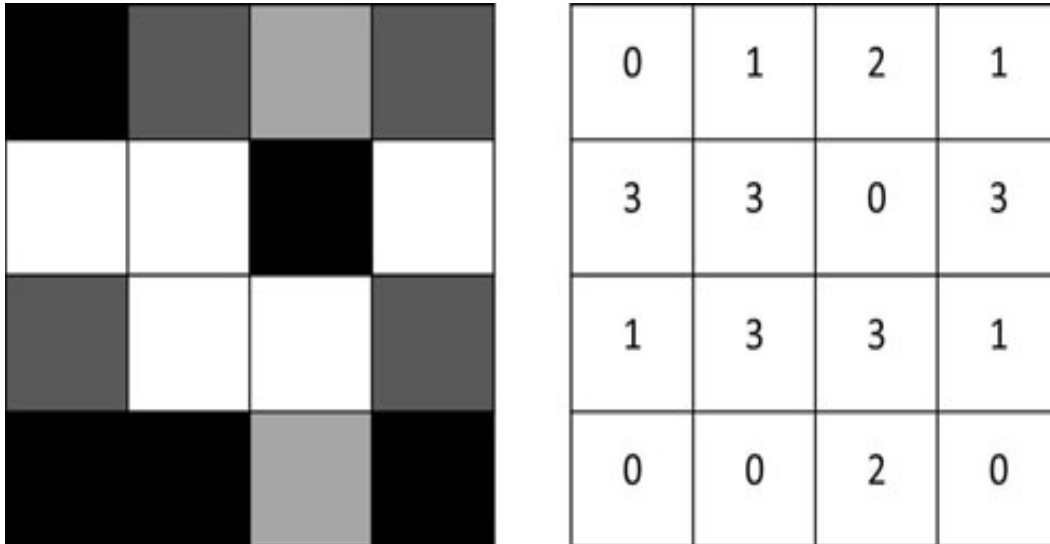
Od svakog ispitanika je uzeta kap periferne krvi iz jagodice prsta, poštujući sve mere asepse i antiseptike. Krvni razmazi su bili fiksirani u apsolutnom metanolu 3-5 min, a zatim obojeni modifikacijom Gimza metode u skladu sa preporučenim protokolom proizvođača Sigma-Aldrich (Procedure No. GS-10) (Sigma-Aldrich, 2014).

U ovom protokolu, filmovi fiksirani metanolom stavljeni su u nerazblaženu Giemsu na 2 min, nakon čega su stavljeni u dejonizovanu vodu na 3 min. Nakon ispiranja u dejonizovanoj vodi, filmovi su osušeni na vazduhu. Jedna od varijanti ove Gimza metode je u prethodnim istraživanjima bila korišćena za vizuelizaciju i kompjutersku teksturalnu analizu hromatinske strukture imunskih ćelija (Pantic et al., 2017).

Digitalne mikrografije struktura nuklearnog hromatina u JPG formatu napravljene su korišćenjem instrumenta TCA1000-C opremljenog Aptina MT9J003 CMOS senzorom montiranim na OPTIC900TH trinokularni biološki mikroskop (COLO LabExperts, Novo Mesto, Slovenija). Dimenzije mikrofotografija bile su 3.584 (širina) × 2.748 (visina) rezolucionih jedinica, sa dubinom bita od 24. U ovom istraživanju, po prvi put je korišćen specifičan pristup zasnovan na podešavanjima akvizicije slike koja, prema našim dosadašnjim iskustvima, u velikoj meri povećava složenost mikrografije, nivo detalja i heterogenost, pružajući više podataka za GLCM, u poređenju sa pristupom koji je ranije korišćen (Topalovic et al., 2021; Pantić et al., 2019.). Ova podešavanja uključuju temperaturu boje sa vrednošću od 4,828, nijansu od 1,362, nijansu sa vrednošću 24, zasićenost od 78 i osvetljenost od 64. Mikrografi su konvertovani u 8-bitni format sivih tonova za analizu teksture (slika 3). GLCM analiza je obavljena u softveru ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) i dodacima koje je razvio Julio E. Cabrera i ažurirao Tobi C. Cornish (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/tekture.html>). Analizirano je ukupno 1.000 regiona od interesa (ROI) reprezentativnih struktura hromatina neutrofila (10 po ispitaniku). GLCM analiza teksture ima za cilj da opiše karakteristike teksture objekta na slici analizom kombinacija intenziteta sive na određenim pozicijama na kojima se nalaze jedna u odnosu na drugu na slici (slika 4) (Topalovic et al., 2021). Statistička analiza teksture se stoga može klasifikovati u statistiku prvog, drugog i višeg reda prema broju tačaka intenziteta (piksela) u svakoj kombinaciji (Carstensen, 1992).



Slika 3. Mikrografi neutrofilnih granulocita su konvertovani u 8-bitni format sivih tonova za analizu teksture. Dve ćelije koje su vidljive na ovoj slici, iako su morfološki slične, imaju različite vrednosti GLCM kontrasta, ASM i IDM (publikovano u Topalovic et al., 2021)



Slika 4. Prilikom formiranja matrice ko-pojavljivanja, svakoj rezolucionoj jedinici se dodeljuje vrednost na osnovu njenog intenziteta sivog, nakon čega se parovi vrednosti analiziraju korišćenjem složenog matematičkog algoritma. Ovo je pojednostavljen prikaz jedinica rezolucije koje imaju samo četiri moguća intenziteta sive boje (0-3) (publikovano u Topalovic *et al.*, 2021)

GLCM analiza teksture predstavlja algoritam koji je zasnovan na statistici drugog reda pri čemu smo izračunavali sledeće vrednosti: angularni drugi momenat (ASM), inverzni momenat razlike (IDM), GLCM kontrast (CON), testuralnu korelaciju (COR) i GLCM varijansu (VAR). Sve parametre u istraživanju smo izračunavali prema sledećim formulama:

$$ASM = \sum_i \sum_j \{p(i, j)\}^2$$

1. Angularni drugi momenat (ASM) se kao parametar izračunava sumiranjem kvadratnih vrednosti svakog elementa u GLCM matrici, gde i i j predstavljaju koordinate matrice (Jordanova *et al.*, 2022)

$$IDM = \sum_i \sum_j \frac{1}{1+(i-j)^2} p(i, j)$$

2. Izračunavanje inverznog momenta razlike (IDM), u ovoj formuli, (ij) predstavlja razliku između vrednosti sivog nivoa dva susedna piksela, a 1 se dodaje imeniocu da bi se izbeglo deljenje sa nulom. Koristeći inverznu kvadratnu razliku između vrednosti nivoa sivog, IDM daje veću težinu parovima piksela koji su bliži po vrednosti, što ukazuje na ujednačeniju ili homogeniju teksturu. IDM meri lokalnu homogenost slike. Učestalost istovremene pojave parova piksela se povećava kada su oni blizu vrednosti

sive skale i na taj način povećava IDM vrednost. Zbog težinskog faktora $(1 + (i - j)^2 - 1)$, ishod je mali doprinos nehomogenih oblasti $i = j$. Rezultat je niska IDM vrednost za nehomogene slike i relativno viša vrednost za homogene slike. IDM se kreće između 0 i 1 (Yang et al., 2012)

$$CON = \sum_i \sum_j (i - j)^k P_d[i, j] n$$

3. GLCM kontrast (CON) u osnovi procenjuje razliku u vrednostima sive između dve susedne rezolucione jedinice. On je obrnuto proporcionalan momentu inverzne razlike jer procenjuje heterogenost strukture. Zbog toga, ova statistička mera će se povećavati ukoliko budu postojale lokalne promene u strukturi hromatina, kao što je promena euhromatina u heterohromatin.

$$COR = \frac{\sum_i \sum_j (ij) - \mu_x \mu_y}{\sigma_x \sigma_y}$$

4. Teksturalna korelacija (COR) je teksturalni parametar koji prilikom kalkulacije preračunava srednje vrednosti intenziteta sivih rezolucioničkih jedinica (μ) i standardne devijacije (σ) za odgovarajući smer (x) i (y) u matrici. Formula izračunava kovarijansu između vrednosti intenziteta sive boje susednih piksela, normalizovanih njihovim standardnim devijacijama. Korelacija može imati vrednost od -1 do $+1$. Kada teksturna organizacija jedinica rezolucije nije u korelaciji, označava se sa 0, dok vrednosti $+1$ i -1 ukazuju na savršenu pozitivnu ili negativnu korelaciju (Jordanova et al., 2022)

$$VAR = \sum_i \sum_j \{i - \mu\}^2 (i, j)$$

5. Parametar GLCM varijanse (VAR) se izračunava uzimanjem zbira kvadratne razlike između svake vrednosti intenziteta sive boje i srednje vrednosti intenziteta nivoa sive boje matrice ko-pojavljivanja, pomnožene odgovarajućom normalizovanom vrednošću matrice istovremenih pojavljivanja. Drugim rečima, meri koliko su elementi matrice istovremenog pojavljivanja na sivom nivou udaljeni od prosečne vrednosti matrice. Prethodne publikacije su potvrdile da GLCM varijansa predstavlja jedan od najsenzitivnijih parametara GLCM analize, posebno kada se radi o strukturnim diskretnim promenama u citoarhitekturi ćelije, kao i promenama u tkivnoj heterogenosti (Zhang et al., 2017)

3.4. Metode za procenu mentalnog distresa

Svi ispitanici su bili zamoljeni da popune validirani, strukturisani upitnik koji se sastojao od 3 dela. Prvi deo upitnika je predstavljala Skala depresivnosti, anksioznosti i stresa DASS-21 (*Depression Anxiety Stress Scales*) čija je validacija na srpski jezik prethodno obavljena (Jovanovic et al., 2014). DASS-21 skala je predstavljala alat kojim smo vršili procenu tri posebne, ali usko povezane komponente mentalnog distresa: depresivnost, anksioznost i stres. Analizom dobijenih rezultata putem ove skale merili smo težinu mentalnog distresa. Skala se sastoji od 21 stavke koje su ocenjene na Likertovoj skali od četiri tačke u rasponu od 0 (uopšte se ne odnosi na mene - nikada) do 3 (veoma često se odnosi na mene - skoro uvek) (Jebb et al., 2021). Da bi se analizirala DASS-21 skala, rezultati za svaku podskalu (depresija, anksioznost i stres) se izračunavaju odvojeno sumiranjem rezultata stavki koje pripadaju svakoj podskali. Rezultati podskale se mogu kretati od 0 do 21, pri čemu viši rezultati ukazuju na teže simptome depresije, anksioznosti ili stresa. Ukupan rezultat smo izračunavali sumiranjem pojedinačnih rezultata svake od 21 stavki, čime smo dobili opštu meru mentalnog distresa. Ukupan rezultat je mogao da se kreće u rasponu od 0 do 63, pri čemu su viši rezultati ukazivali na veći nivo mentalnog distresa.

Drugi deo upitnika je predstavljala skala za procenu generalizovane anksioznosti GAD-7 (*Generalized anxiety disorder*) čija je validacija na srpski jezik prethodno obavljena (Rokvic, 2019). Skrining upitnik GAD-7 je specijalno dizajniran da može sa velikom tačnošću da prepozna i meri hronično i postojano osećanje zabrinutosti koje je senzitivniji alat za procenu od DASS-21 skale. GAD-7 skalu smo koristili za procenu i merenje težine simptoma povezanih sa generalizovanim anksioznim poremećajem. Skala sadrži 7 pitanja. Svako pitanje se odnosi na to koliko ih je, tokom poslednje 2 nedelje, opterećivao svaki od 7 osnovnih simptoma generalizovanog anksioznog poremećaja. Opcije odgovora su bile „uopšte ne“, „nekoliko dana“, „duže od sedam dana“ i „skoro svaki dan“, ocenjene sa 0, 1, 2 i 3, respektivno. Prema analizama odgovora, rezultati GAD-7 skale se kreću od 0 do 21, pri čemu ocene od ≥ 5 , ≥ 10 i ≥ 15 predstavljaju blage, umerene i teške nivoe simptoma generalizovanog anksioznog poremećaja (Lowe et al., 2008).

Treći deo upitnika je obuhvatio skalu za procenu emocionalne regulacije ERQ (*Emotion Regulation Questionnaire*) čija je verzija na srpskom jeziku prethodno takođe validirana (Popov et al., 2016). Ovom skalom koja sadrži 10 pitanja su kvantifikovana dva modaliteta emocionalne regulacije koji su usko povezani sa mentalnim distresom: kognitivna preformulacija (6 pitanja) i emocionalna supresija (4 pitanja) (Sorman et al., 2022). Stavke se ocenjuju na Likertovoj skali od sedam tačaka, u rasponu od 1 (= potpuno netačno) do 7 (= potpuno tačno) (Jebb et al., 2019). Stavke u podskali kognitivne preformulacije mere sklonost pojedinca da kognitivno preoblikuje ili reinterpreтира emocionalne događaje kako bi regulisao svoje emocionalne reakcije.

Stavke u podskali emocionalne supresije mere sklonost pojedinca da inhibira ili potisne svoje emocionalne reakcije (Sorman et al., 2022). Da bi analizirali ERQ skalu, neophodno je izračunati rezultate za svaku podskalu, sumiranjem odgovora na relevantna pitanja. Viši rezultati na subskali kognitivne preformulacije ukazuju na veću upotrebu ovog elementa kao strategije za regulisanje emocija, dok viši rezultati na subskali emocionalne supresije ukazuju na veću upotrebu potiskivanja emocija kao regulatorne strategije. Rezultati se upoređuju sa normama (Sorman et al., 2022).

3.5. Procena intenziteta fizičke aktivnosti

U našoj studiji smo kao alat za procenu intenziteta fizičke aktivnosti koristili kratku formu Međunarodnog upitnika o fizičkoj aktivnosti (*engl. IPAQ - International Physical Activity Questionnaire*). Validacija upitnika za populaciju u Srbiji je prethodno urađena (Stojmenović and Milosavljević, 2017). IPAQ je upitnik koji se sastoji od sedam pitanja dizajniranih da procene intenzitet fizičke aktivnosti u prethodnih sedam dana. Pitanja su grupisana u tri kategorije:

1. Aktivnosti napornog intenziteta: Pitanja 1-2 ispituju o dužini vremena provedenog u aktivnostima napornog intenziteta tokom prethodnih sedam dana, uključujući aktivnosti kao što su podizanje tereta, kopanje, aerobik ili brza vožnja bicikla.

2. Aktivnosti umerenog intenziteta: Pitanja 2-4 ispituju o dužini vremena provedenog u aktivnostima umerenog intenziteta tokom prethodnih sedam dana, uključujući aktivnosti kao što su vožnja bicikla umerenim naporom, ples, plivanje ili nošenje lakih tereta.

3. Aktivnosti niskog intenziteta - šetnja i sedenje: Pitanja 5-7 se odnose na dužinu vremena provedenog u šetnji i sedenju tokom prethodnih sedam dana, kako u svrhe prevoza, tako tokom slobodnog vremena.

Protokol administracije, uputstva i sva objašnjenja koja je trebalo dati ispitanicima su standardizovana. Pre popunjavanja upitnika, svim ispitanicima je detaljno objašnjena procedura davanja odgovora. Akcenat je stavljen na uslov da se evidentiraju samo fizičku aktivnost u kojoj su učestvovali najmanje 10 min u pojedinačnoj sesiji. Za svako pitanje, od ispitanika se tražilo da navedu broj dana u nedelji i dužinu vremena tokom dana koji su proveli u navedenoj aktivnosti. Ukupna dužina vremena provedenog u svakoj kategoriji aktivnosti izračunava se množenjem broja dana u nedelji sa dužinom vremena dnevno, a ukupan intenzitet fizičke aktivnosti izračunavao se sabiranjem vremena provedenog u svakoj kategoriji. Prema IPAQ MET metodi ocenjivanja intenziteta fizičke aktivnosti, ukupan skor fizičke aktivnosti (FA skor) za svaki intenzitet FA napornog, umerenog i niskog intenziteta je izračunat i izražen u MET minutima nedeljno ($\text{MET} \cdot \text{min} \cdot \text{ned}^{-1}$) (Tabela 4) (Papathanasiou et al., 2009).

MET (*engl. Metabolic Equivalent of Task*) predstavlja internacionalnu jedinicu koja se koristi za procenu potrošnje energije tokom fizičkih aktivnosti (Mendes et al., 2018). Jedan MET se definiše kao količina energije koja se troši u mirovanju, što je približno 3,5 mililitara kiseonika po kilogramu telesne težine u minuti ($\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (Ainsworth et al., 2011).

Na osnovu ovih uputstava, ukupan skor naporne fizičke aktivnosti je dobijen tako što se vreme utrošeno za obavljanje naporne fizičke aktivnosti u proteklih 7 dana pomnožilo sa korekcionim faktorom 8 MET. Ukupan skor umerene fizičke aktivnosti je dobijen tako što se vreme utrošeno za obavljanje umerene fizičke aktivnosti u proteklih 7 dana pomnožilo sa korekcionim faktorom 4 MET, a ukupan skor fizičke aktivnosti niskog intenziteta je dobijen tako što se vreme utrošeno za obavljanje niske fizičke aktivnosti u proteklih 7 dana pomnožilo sa korekcionim faktorom 3.3. Na taj način su skorovi naporne, umerene i fizičke aktivnosti niskog intenziteta izračunati za svakog ispitanika pojedinačno. Ukupan skor fizičke aktivnosti je izračunat na osnovu zbira naporne, umerene i fizičke aktivnosti niskog intenziteta (tabela 4). Na osnovu skora ukupne i/ili naporne fizičke aktivnosti, svi ispitanici mogu biti klasifikovani u tri kategorije intenziteta fizičke aktivnosti: visok, umeren i nizak intenzitet (Stojmenović and Milosavljević, 2017).

U našoj studiji, ispitanici su prema kriterijuma za klasifikaciju fizičke aktivnosti na osnovu skorova IPAQ analize bili podeljeni u dve kategorije: prva grupa sportista koja su klasifikovani u kategoriju umerene fizičke aktivnosti (pojedinačni skor naporne FA $\geq 480 \text{ MET}\cdot\text{min}\cdot\text{ned}^{-1}$ ili ukupan skor FA $\geq 600 \text{ MET}\cdot\text{min}\cdot\text{ned}^{-1}$) i druga grupa sportista kod kojih je utvrđen visok nivo fizičke aktivnosti (pojedinačni skor naporne FA $1500 \text{ MET}\cdot\text{min}\cdot\text{ned}^{-1}$ ili ukupna vrednost FA $\geq 3\ 000 \text{ MET}\cdot\text{min}\cdot\text{ned}^{-1}$)

Tabela 4. Skorovanje fizičke aktivnosti prema IPAQ vodiču i kriterijumi za klasifikacija fizičke aktivnosti (preuzeto i prevedeno iz Papathanasiou G. et al., 2009)

A. Skorovanje fizičke aktivnosti-FA

Skor naporne FA = $8\text{MET} \times (\text{broj dana sa napornom FA}) \times (\text{dnevno minuta provedenih u napornoj FA})$

Skor umerene FA = $4\text{MET} \times (\text{broj dana sa umerenom FA}) \times (\text{dnevno minuta provedenih u umerenoj FA})$

Skor niske FA = $3.3\text{MET} \times (\text{broj dana sa niskom FA}) \times (\text{dnevno minuta provedenih u niskoj FA})$

Ukupan skor FA = Vrednost naporne FA + Vrednost umerene FA + Vrednost niske FA

Sve vrednosti FA su izražene u $\text{MET}\cdot\text{min}\cdot\text{ned}^{-1}$

Svim ispitanicima je naglašeno da zabeleže samo FA u trajanju od najmanje 10 minuta

Za upisane FA koje su trajale manje od 10 minuta dnevno registrovana je vrednost 0 minuta dnevno

Za upisane FA koje su trajale više od 180 minuta dnevno registrovana je vrednost od 180 minuta dnevno

Sva pitanja sa nepopunjenim informacijama za broj dana ili vreme provedeno u određenoj FA nisu analizirana, kao i pitanja sa odgovorima „nisam siguran“ ili „ne znam“

B. Kriterijumi za klasifikaciju fizičke aktivnosti

Nizak nivo FA: Ukupan skor FA $< 600 \text{ MET} \cdot \text{min} \cdot \text{ned}^{-1}$

Umeren nivo FA: Pojedinični Skor naporne FA $\geq \text{MET} \cdot \text{min} \cdot \text{ned}^{-1}$ ili Ukupan skor FA $\geq \text{MET} \cdot \text{min} \cdot \text{ned}^{-1}$.

Visok nivo FA: Pojedinačni skor naporne FA $\geq 1500 \text{ MET} \cdot \text{min} \cdot \text{ned}^{-1}$ ili Ukupna vrednost FA $\geq 3\ 000 \text{ MET} \cdot \text{min} \cdot \text{ned}^{-1}$

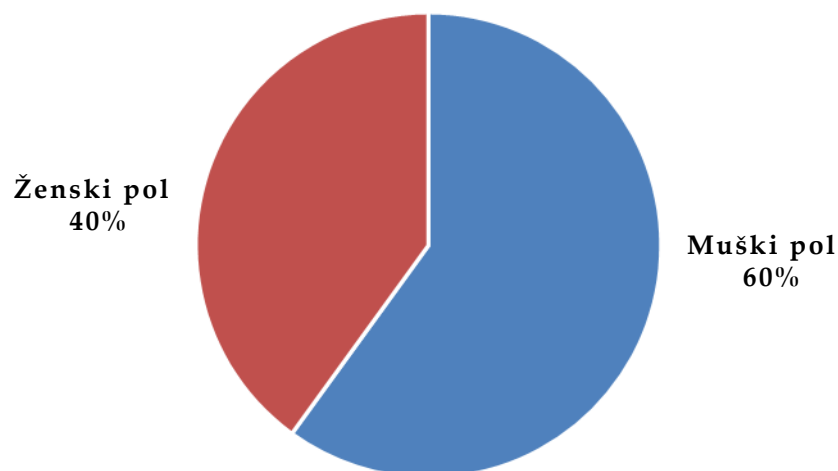
3.6. Statistička analiza podataka

Statistička analiza podataka je obavljena u SPSS programu (v25.0, IBM korporacija, Čikago, IL, USA). Normalnost distribucije rezultata je testirana Kolmogorov - Smirnovljevim testom. U zavisnosti od normalnosti raspodele i parametarske prirode podataka, korelaciona analiza je obavljena određivanjem Pirsonovog ili Spirmanovog korelacionog koeficijenta. Modeli mašinskog učenja su razvijeni u „Scikit-Learn“ biblioteci za „Python“ programski jezik. Radi implementacije koda ove biblioteke korišćena je „Jupyter Notebook“ platforma u okviru „Google Colaboratory“ projekta. Nivo statističke značajnosti je bio $p < 0.05$ (statistički značajna razlika), odnosno $p < 0.01$ (visoka statistička značajnost).

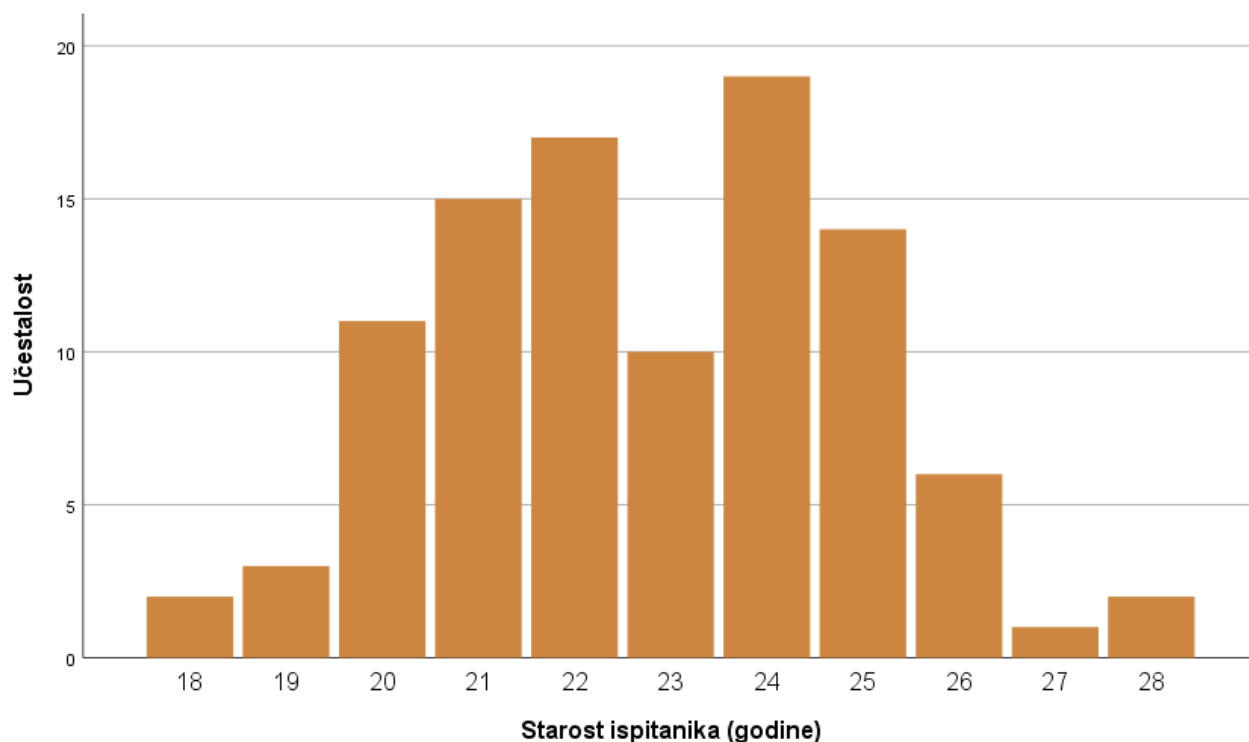
4. REZULTATI

4.1. Demografske karakteristike ispitanika, antropometrijske mere, intenzitet fizičke aktivnosti i rezultati testova za procenu mentalnog distresa

U našem istraživanju je učestvovalo ukupno 100 ispitanika, od toga 40 ženskog i 60 muškog pola.



Grafikon 1. Udeo ženskog i muškog pola u ispitivanom uzorku.



Grafikon 2. Raspodela učestalosti starosti ispitanika u uzorku.

Prosečna starost ispitanika u studiji je iznosila 22.8 ± 2.2 godine, najmlađi ispitanik je imao 18 godina, a najstariji 28 godina. Kod ispitanika muškog pola, prosečna starost je bila 23.1 ± 2.1 godinu, a kod ispitanika

ženskog pola 22.3 ± 2.1 godinu. Prosečna telesna masa ispitanika bila je 78.7 ± 16.1 kg, a visina 181.6 ± 8.8 cm. Srednji indeks telesne mase je bio 23.7 ± 3.4 . Procenjeno je da je srednji udeo masti u telesnoj kompoziciji ispitanika bio $18.5 \pm 7.9\%$ a mišića $46.1 \pm 5.3\%$.

Tabela 5. Demografske i antropometrijske karakteristike ispitanika (n=100)

	Min	Max	\bar{X}	SD
Starost (godina)	18	28	22.8	2.2
Telesna visina (cm)	161	200	181.7	8.8
Telesna masa (kg)	49	120	78.7	16.1
BMI (kg/m²)	17.6	35.1	23.7	3.4
%masti	3.0	42.3	18.5	7.9
%mišića	31.6	57.2	46.2	5.3

\bar{X} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija; Med - medijana; Min - najmanja vrednost parametra; Max - najveća vrednost parametra

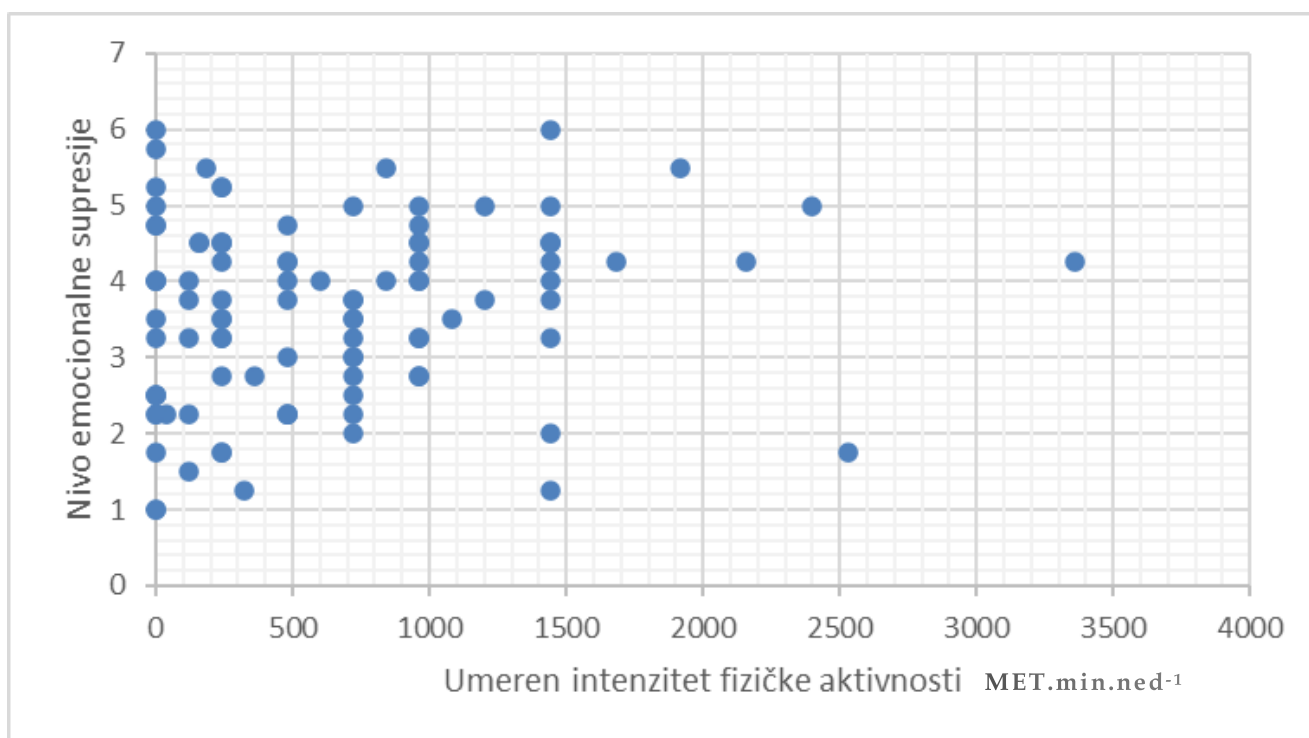
Tabela 6. Demografske i antropometrijske karakteristike prikazane u odnosu na pol ispitanika (n=100)

Parametar	Pol	\bar{X}	SD	Min	Max	p (žene vs. muškarci)
Starost (godina)	M	23.1	2.1	19.0	28.0	<0.01**
	Ž	22.3	2.1	18.0	26.0	
Telesna visina (cm)	M	187.4	5.4	176.0	200.0	<0.01**
	Ž	173.1	5.5	161.0	184.0	
Telesna masa (kg)	M	88.4	12.3	62.0	120.0	<0.01**
	Ž	64.3	8.5	49.0	88.0	
BMI (kg/m²)	M	25.1	3.1	17.7	35.1	<0.01**
	Ž	21.4	2.6	17.6	30.8	
%masti	M	14.8	7.0	3.0	35.8	<0.01**
	Ž	24.0	5.7	13.0	42.3	
%mišića	M	48.9	4.2	36.9	57.2	<0.01**
	Ž	42.0	3.9	31.6	56.7	

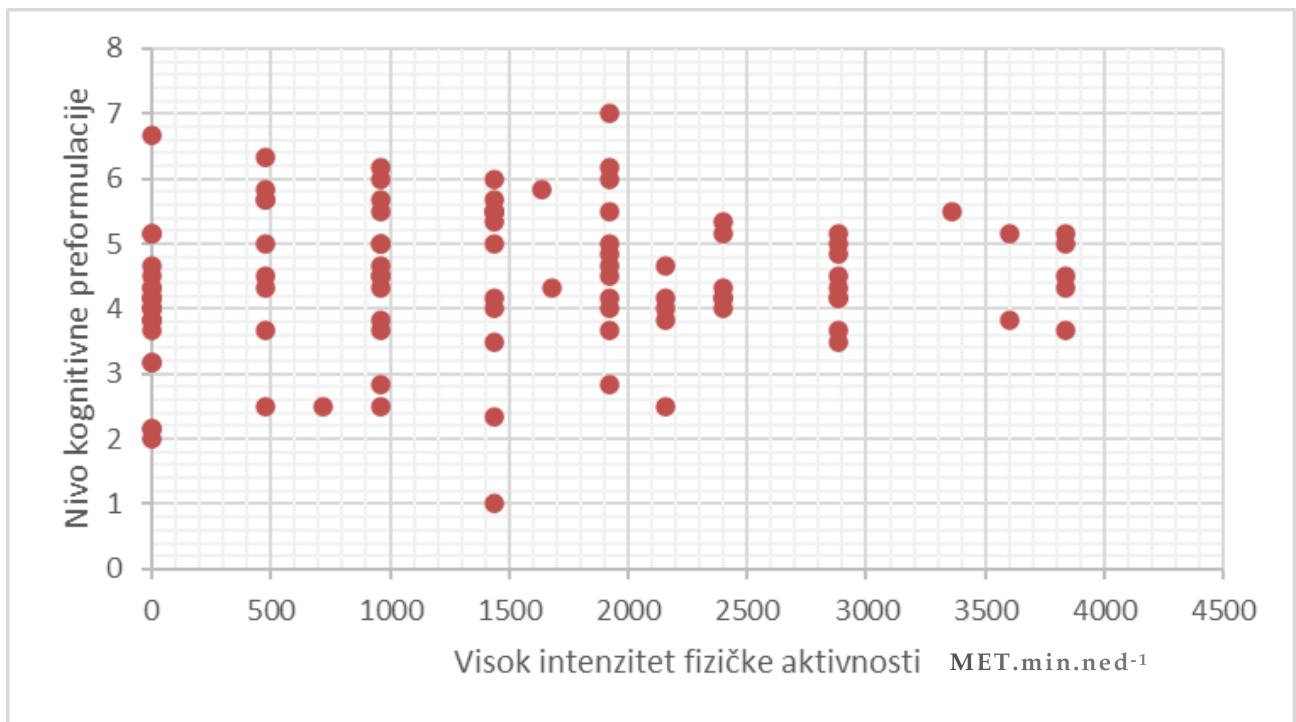
*p<0,05. \bar{X} - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija; Med - medijana; Min - najmanja vrednost parametra; Max - najveća vrednost parametra

Prema rezultatima IPAQ upitnika, skor naporne fizičke aktivnosti iznosio je 1429.9 ± 1141.9 MET.min.ned⁻¹, skor umerene fizičke aktivnosti 650.0 ± 647.2 MET.min.ned⁻¹, a skor fizičke aktivnosti niskog intenziteta 1680.7 ± 1034.4 MET.min.ned⁻¹. Prosečan ukupan broj MET minuta nedeljno je iznosio 3754.2 ± 1776.5 . Prema IPAQ kriteriju za klasifikaciju fizičke aktivnosti, umeren nivo intenziteta FA je procenjen kod 38 ispitanika, dok je visok nivo intenziteta FA procenjen kod 62 ispitanika.

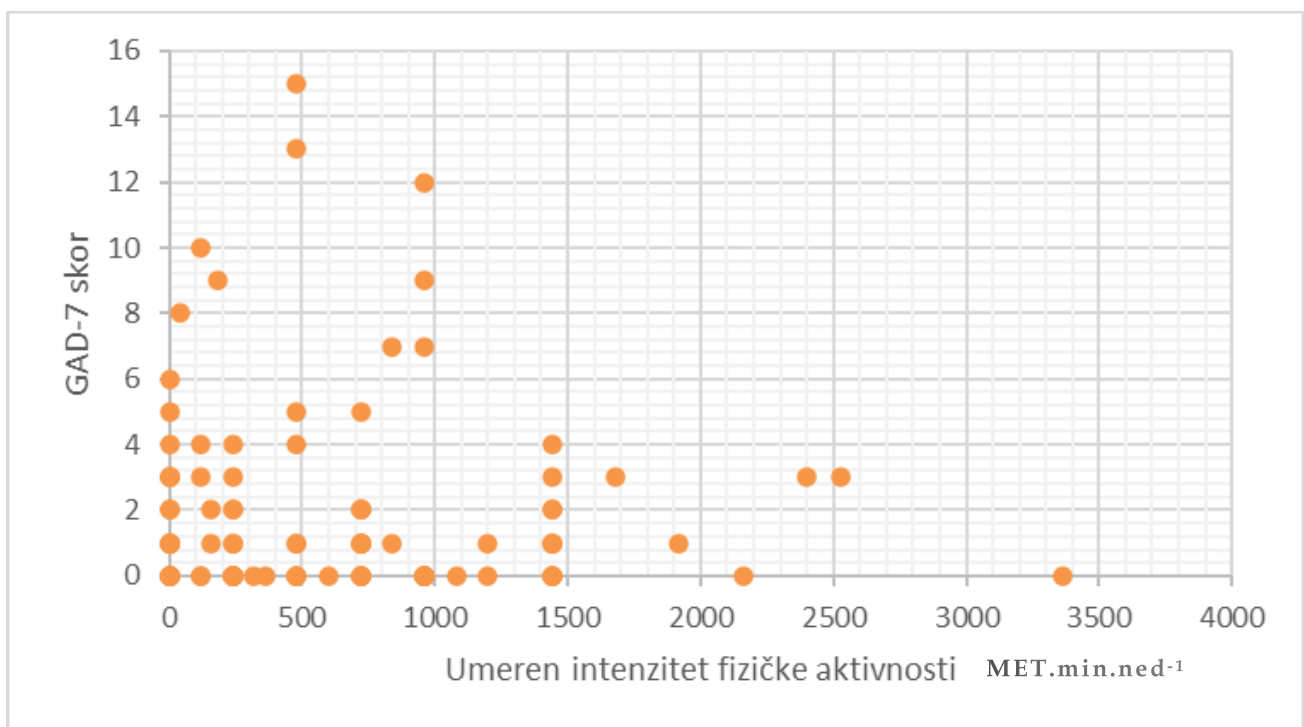
Srednja vrednost skora za anksioznost izračunata uz pomoć GAD-7 upitnika je iznosila 2.1 ± 3.1 . Prosečna vrednosti ERQ skorova su bile 4.42 ± 1.09 za kognitivnu preformulaciju, odnosno 3.61 ± 1.19 za emocionalnu supresiju. Srednje vrednosti DASS skorova su iznosile 5.9 ± 7.5 za anksioznost, 5.1 ± 9.4 , odnosno 18.5 ± 14.6 za mentalni distres. Nakon obavljene korelacione analize, nije detektovana statistički značajna povezanosti između skorova za fizičku aktivnost i nivoa anksioznosti, depresije i mentalnog stresa kod ispitanika ($p > 0.05$). Takođe, nije bilo statistički značajne povezanosti između intenziteta fizičke aktivnosti i stepena kognitivne preformulacije, odnosno emocionalne supresije ($p > 0.05$).



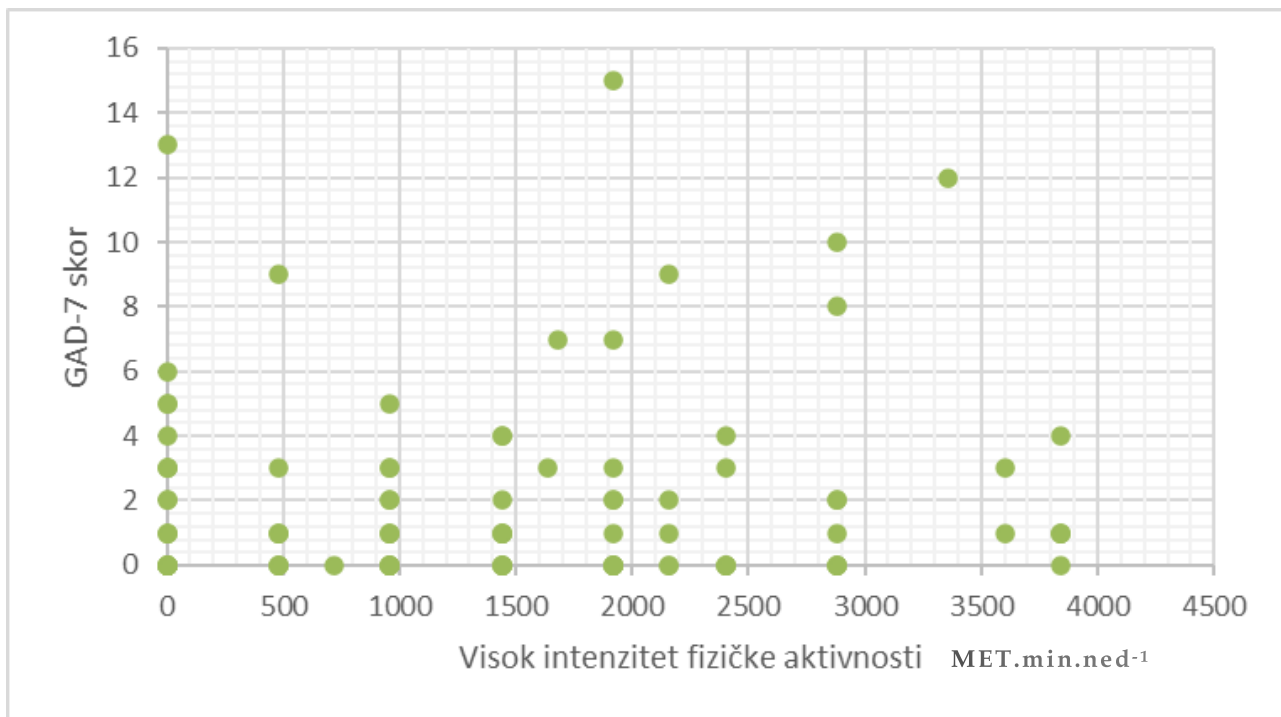
Grafikon 3. Plotovane vrednosti skale emocionalne regulacije - skora emocionalne supresije i umerenog intenziteta fizičke aktivnosti. Nije utvrđena statistički značajna povezanost.



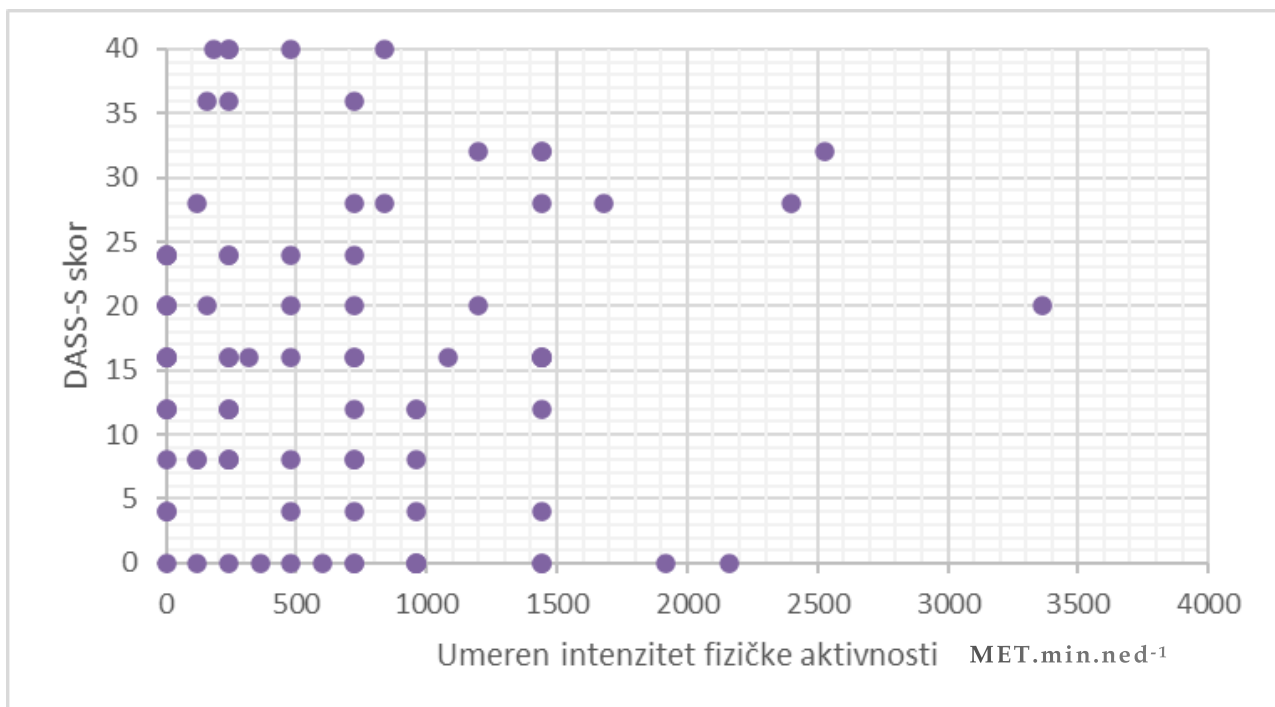
Grafikon 4. Plotovane vrednosti skale emocionalne regulacije - skora kognitivne preformulacije i visokog intenziteta fizičke aktivnosti. Nije utvrđena statistički značajna povezanost.



Grafikon 5. Plotovane vrednosti skora za procenu generalizovane anksioznosti (GAD-7) i umerenog intenziteta fizičke aktivnosti. Nije nađena statistički značajna povezanost.



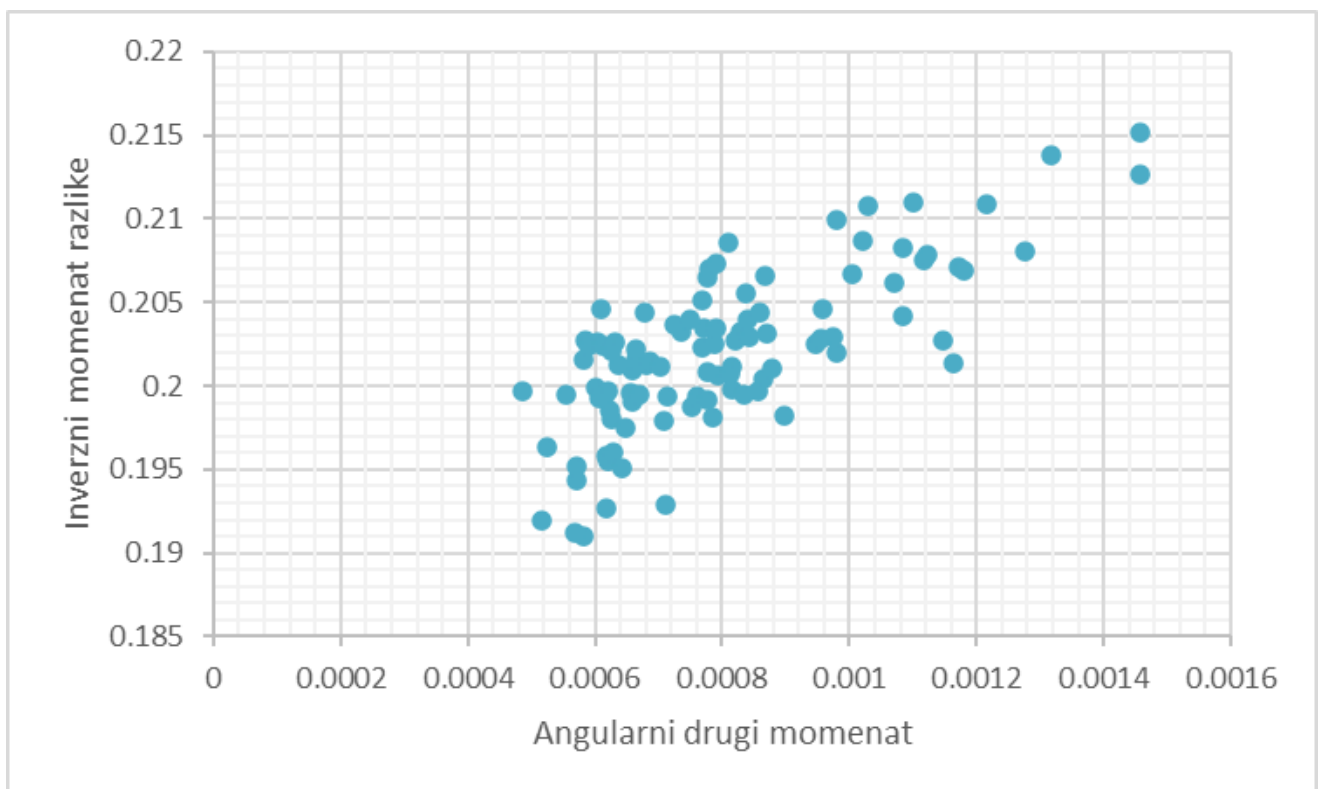
Grafikon 6. Plotovane vrednosti skora za procenu generalizovane anksioznosti (GAD-7) i visokog intenziteta fizičke aktivnosti. Nije nađena statistički značajna povezanost.



Grafikon 7. Plotovane vrednosti skora skale depresivnosti, anksioznosti i stresa (DASS-21) i umerenog intenziteta fizičke aktivnosti. Nije nađena statistički značajna povezanost.

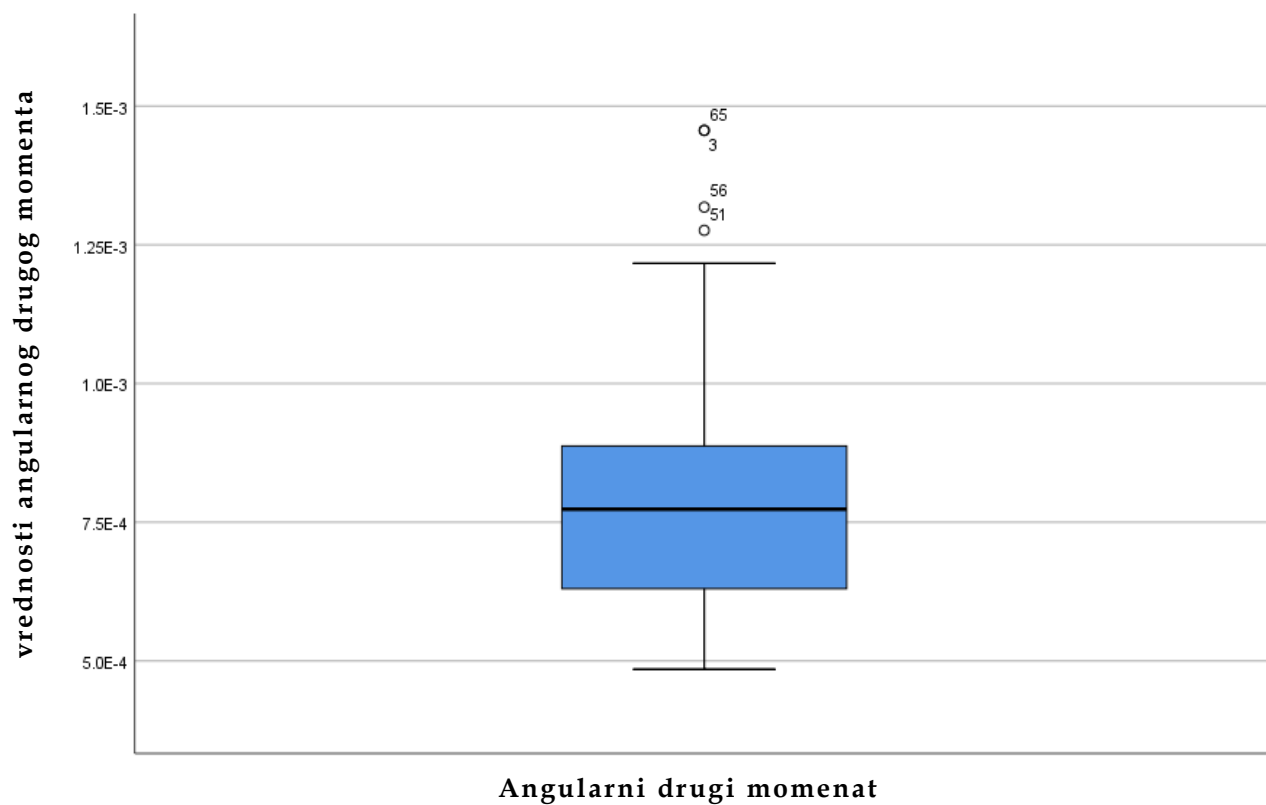
4.2. Teksturalni indikatori neutrofilnih granulocita i njihova povezanost sa intenzitetom fizičke aktivnosti i rezultatima mentalnog distresa

Prosečna vrednost angularnog drugog momenta jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi iznosila je 0.0008 ± 0.0002 , dok je srednja vrednost inverznog momenta razlike iznosila 0.202 ± 0.005 . Angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike su bili u statistički značajnoj korelaciji ($p < 0.01$) što je očekivano i potvrđuje metodološku ispravnost analize, imajući u vidu da oba parametra kvantifikuju određene aspekte teksturalne homogenosti (angularni drugi momenat uniformnost, a inverzni momenat razlike lokalnu homogenost).

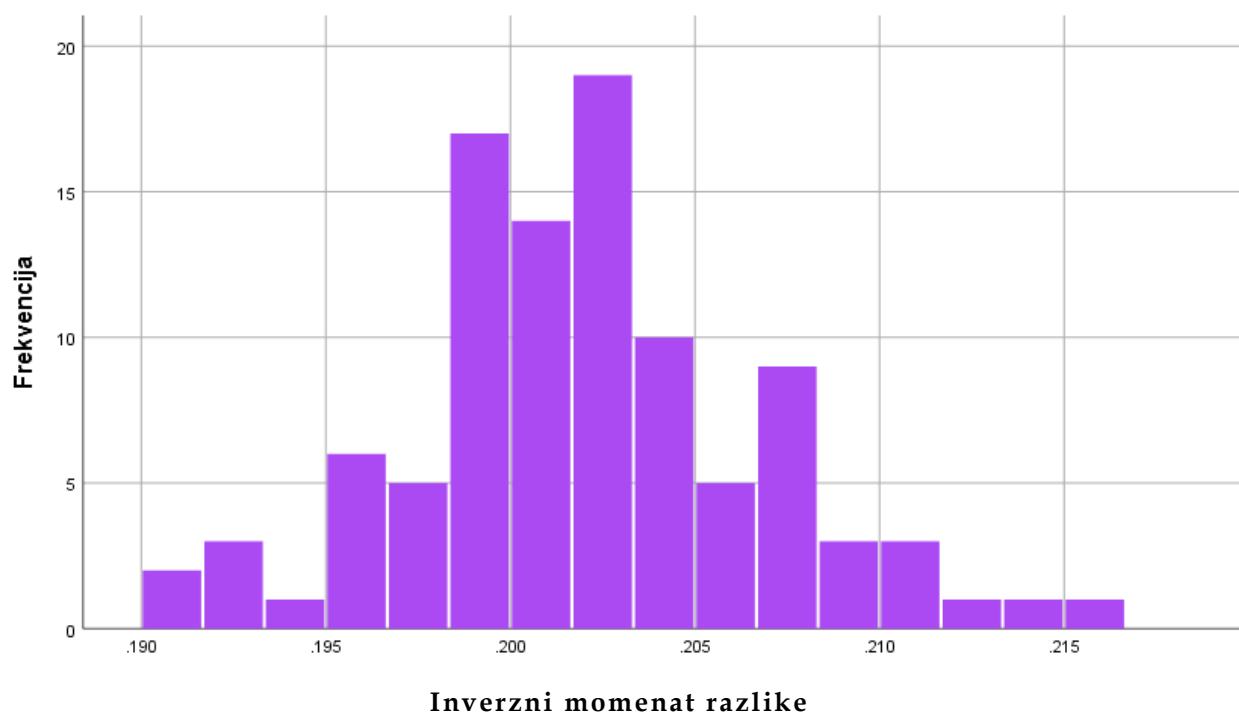


Grafikon 8. Plotovane vrednosti angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi. Detektovana je statistički visoko značajna povezanost ($p < 0.01$).

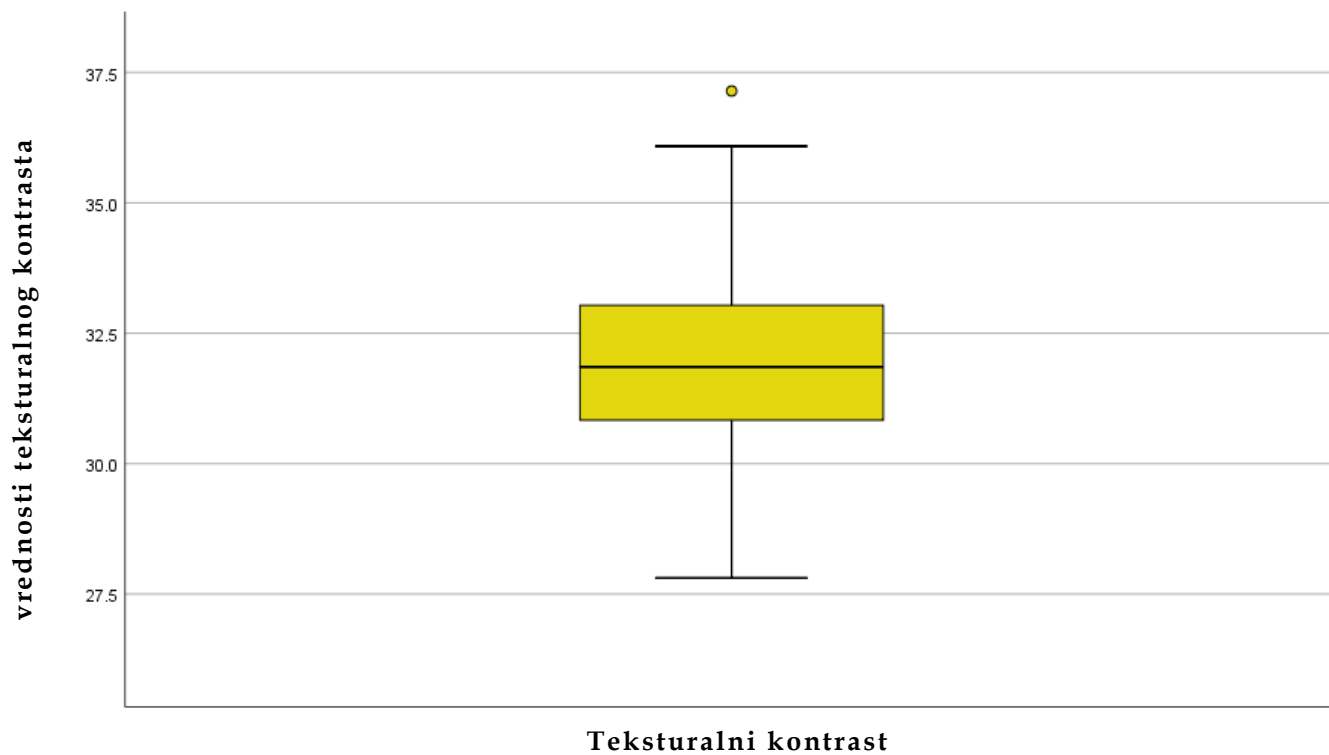
Prosečne vrednosti teksturalnog kontrasta jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi iznosila je 32.1 ± 1.7 , a teksturalne korelacije 0.001 ± 0.0006 . Prosečna vrednost teksturalne varijanse jedarne strukture je bila 1341.8 ± 303.6 . Identično kao i kod vrednosti angularnog drugog momenta i inverznog momenta razlike, i ovde su detektovane statistički visoko značajne korelacije koje verifikuju metodološku validnost GLCM algoritma.



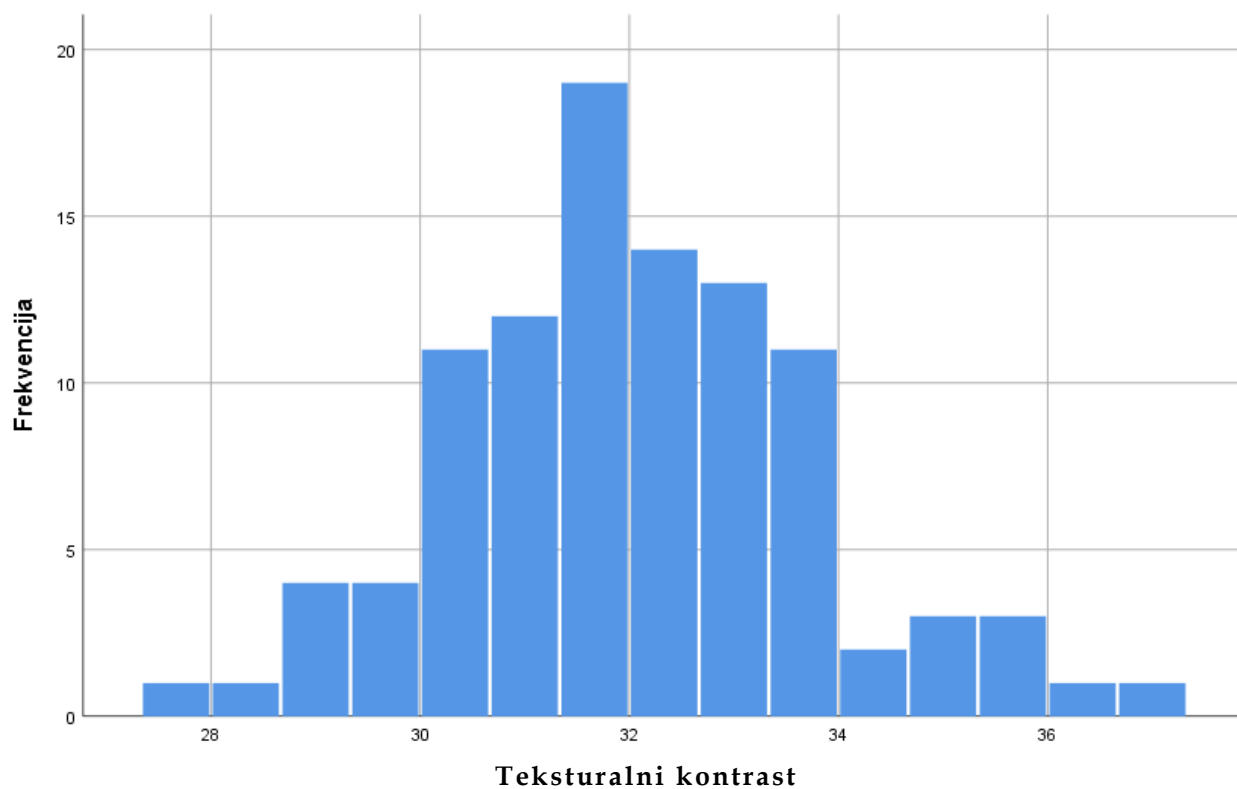
Grafikon 9. Dijagram stabljike i lista vrednosti angularnog drugog momenta u uzorku.



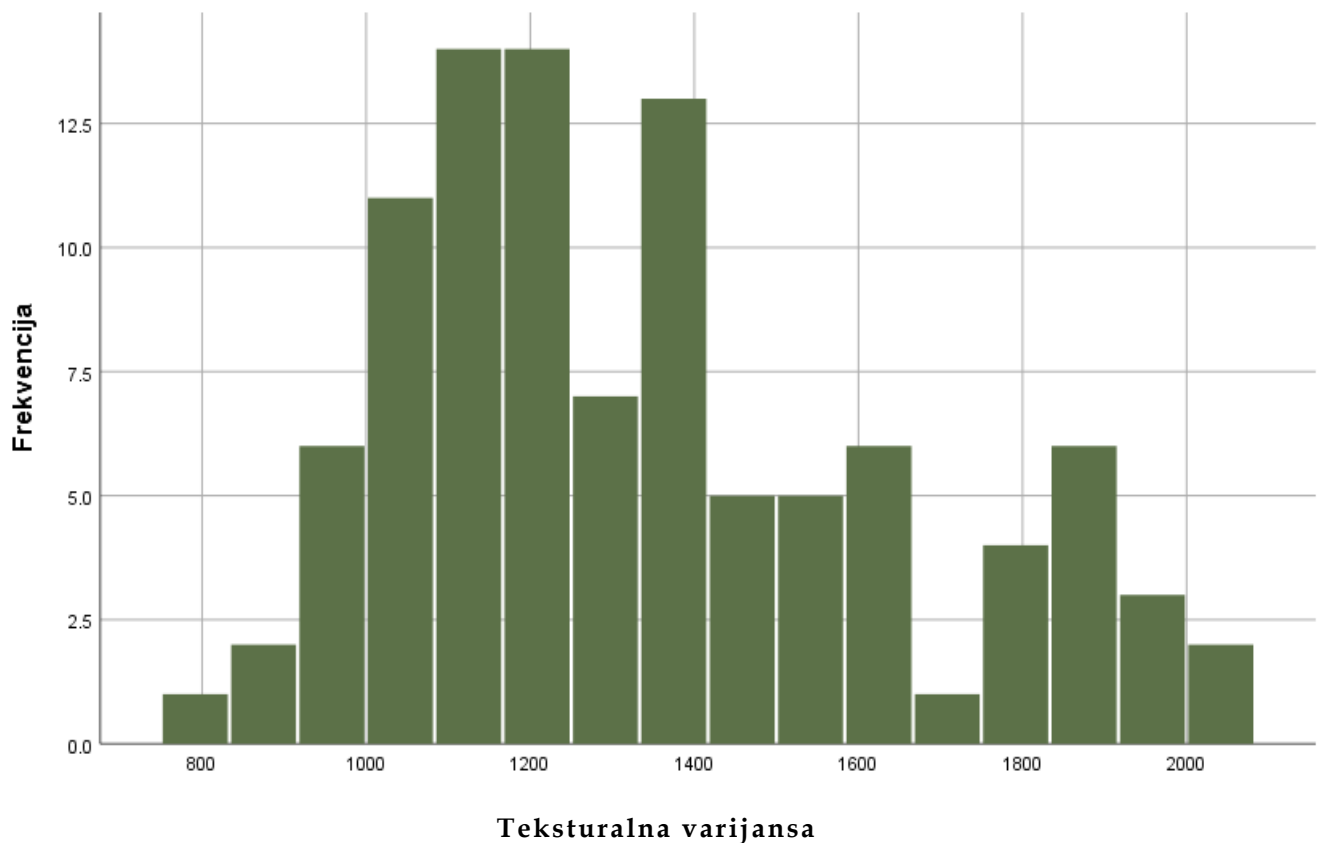
Grafikon 10. Histogram distribucije frekvencija inverznog momenta razlike u uzorku.



Grafikon 11. Dijagram stabljike i lista vrednosti teksturalnog kontrasta jedarne strukture.



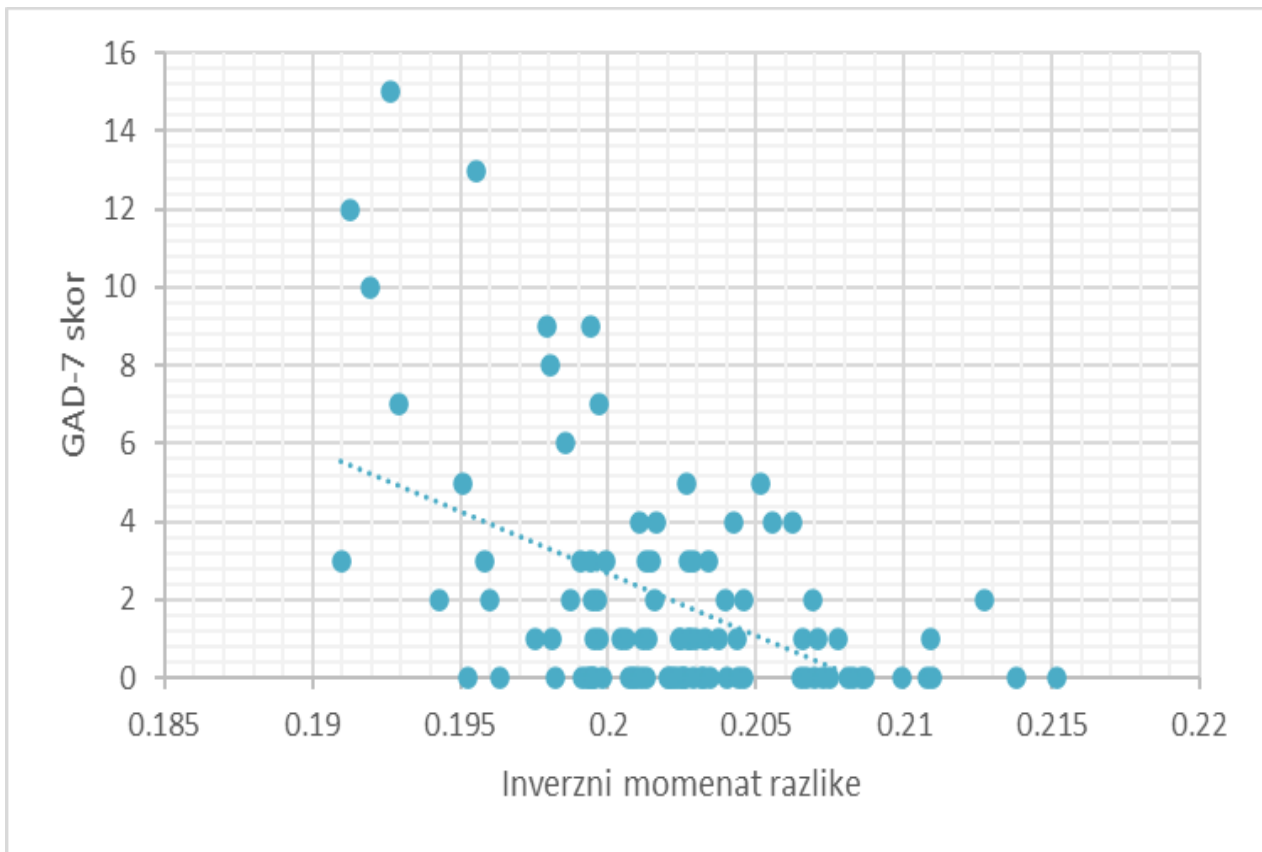
Grafikon 12. Histogram distribucije frekvencija teksturalnog kontrasta jedarne strukture u uzorku.



Grafikon 13. Histogram distribucije frekvencija teksturalne varijanse jedarne strukture u uzorku.

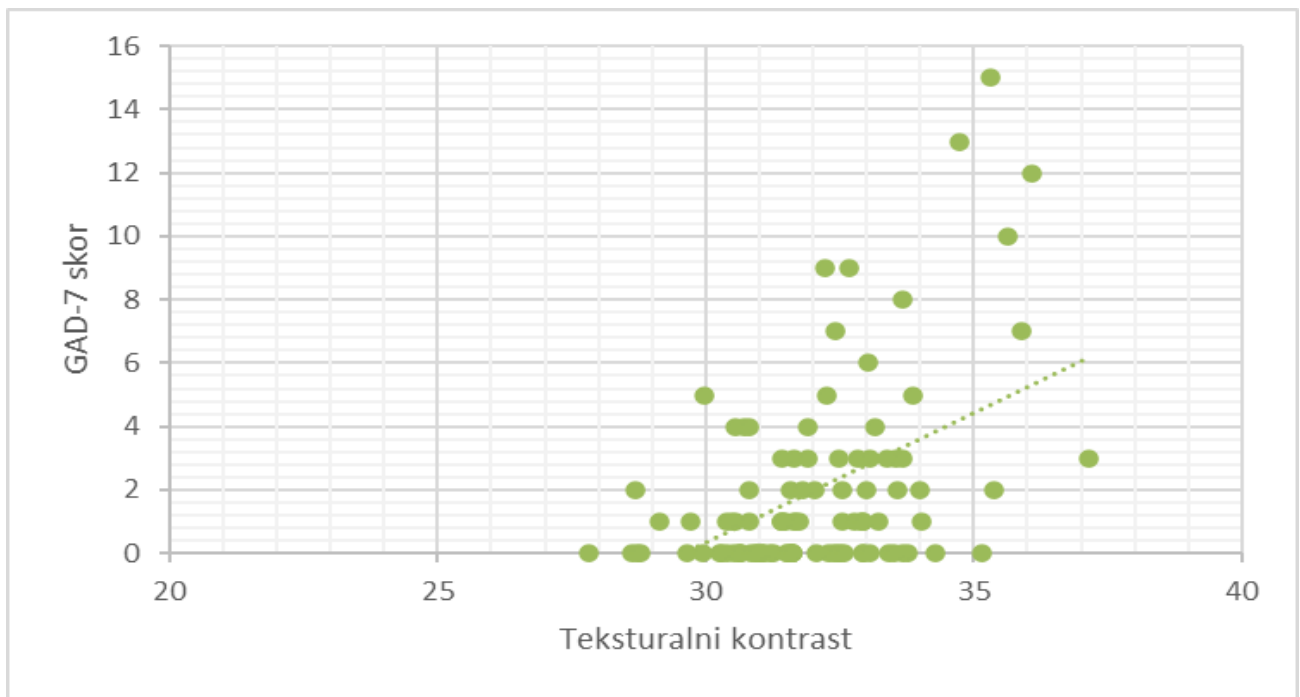
Detektovana je statistički visoko značajna negativna korelacija između vrednosti inverznog momenta razlike jedarne strukture neutrofilnih granulocita i DASS-21 skora ($r=-0.61$, $p<0.01$). Slična, takođe negativna i statistički visoko signifikantna korelacija je pronađena između ovog skora i angularnog drugog momenta ($r=-0.47$, $p<0.01$). Sa druge strane, GLCM kontrast je bio pozitivno povezan sa ovim skorom, a povezanost je takođe bila statistički visoko značajna ($r=+0.61$, $p<0.01$).

Nivo anksioznosti meren GAD-7 skorom je takođe bio statistički značajno povezan sa teksturalnim indikatorima jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi. Utvrđena je statistički visoko značajna negativna korelacija između angularnog drugog momenta i nivoa anksioznosti ($r=-0.34$, $p<0.01$). Sumarno, povećanje nivoa anksioznosti je u uzorku bilo praćeno smanjenjem teksturalne uniformnosti jedra neutrofilnih granulocita, i obratno, ispitanici sa smanjenim nivoom anksioznosti su imali veći nivo teksturalne uniformnosti jedra ovih ćelija. Slična, ali još jača negativna korelacija je utvrđena između GAD-7 skora i inverznog momenta razlike jedarne strukture ($r=-0.39$, $p<0.01$).

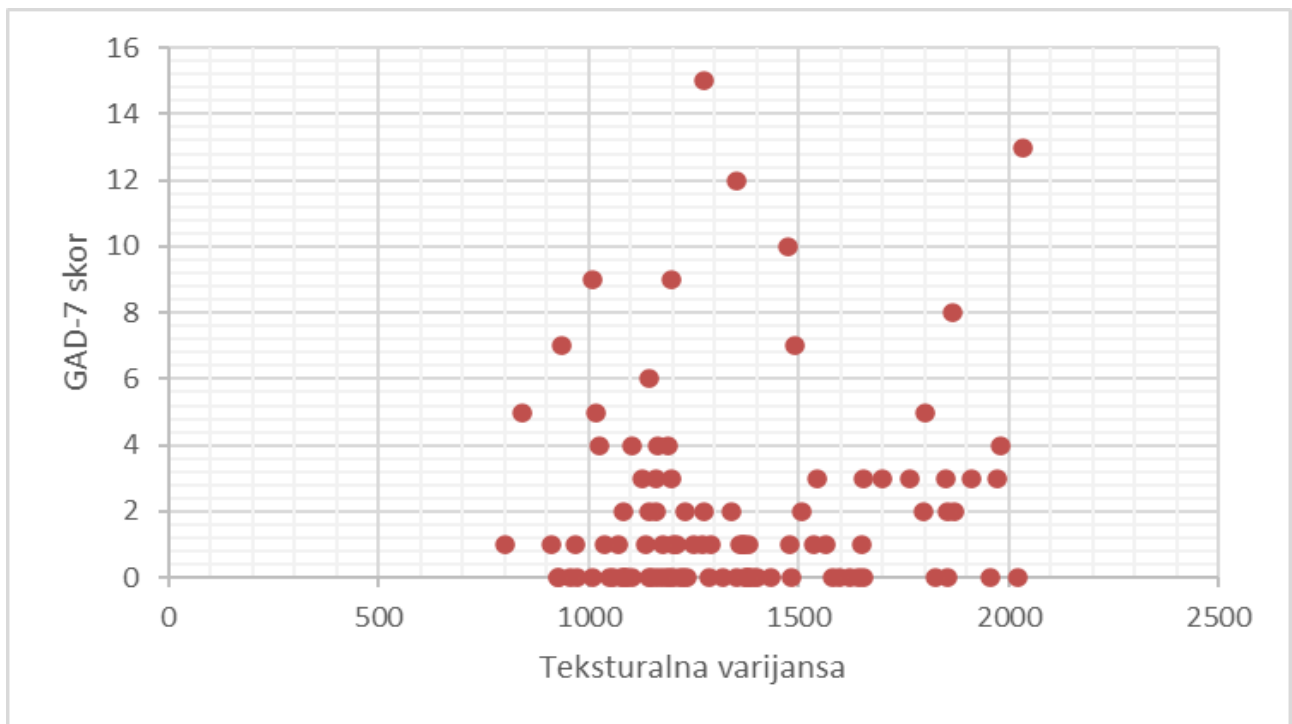


Grafikon 14. Plotovane vrednosti inverznog momenta razlike jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi i skora za procenu generalizovane anksioznosti (GAD-7). Detektovana je statistički visoko značajna povezanost ($p < 0.01$).

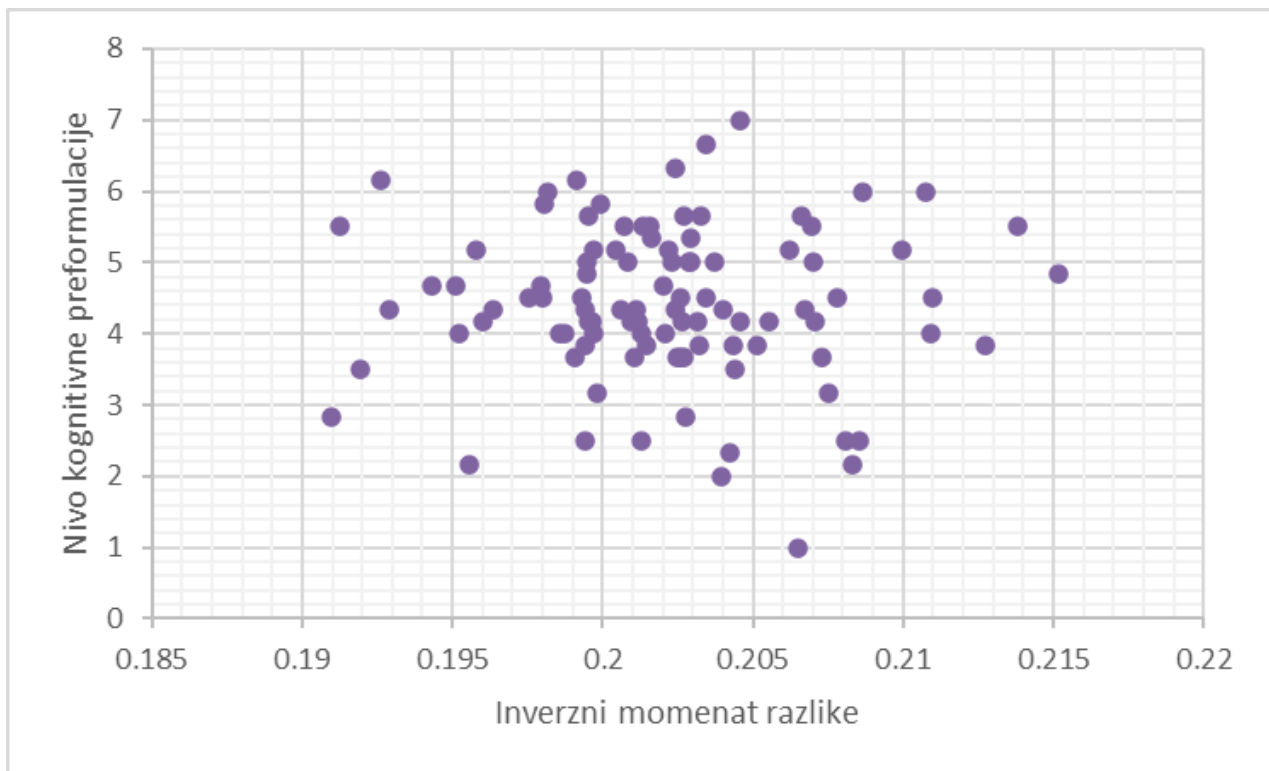
Sa druge strane, veoma jaka ali pozitivna, statistički visoko signifikantna korelacija je detektovana između teksturalnog kontrasta jedarne strukture ćelija i nivoa anksioznosti merene GAD-7 skalom ($r = +0.38$, $p < 0.01$). Drugim rečima, sa povećanjem nivoa anksioznosti, došlo je do povećanja vrednosti teksturalnog kontrasta i obratno. Nije utvrđena značajna povezanost između anksioznosti i vrednosti teksturalne varijanse jedra neutrofilnih granulocita ($r = 0.09$, $p > 0.05$). Takođe, nije utvrđena statistički značajna korelacija između anksioznosti i teksturalne korelacije jedra kao parametra GLCM analize ($r = -0.12$, $p > 0.05$).



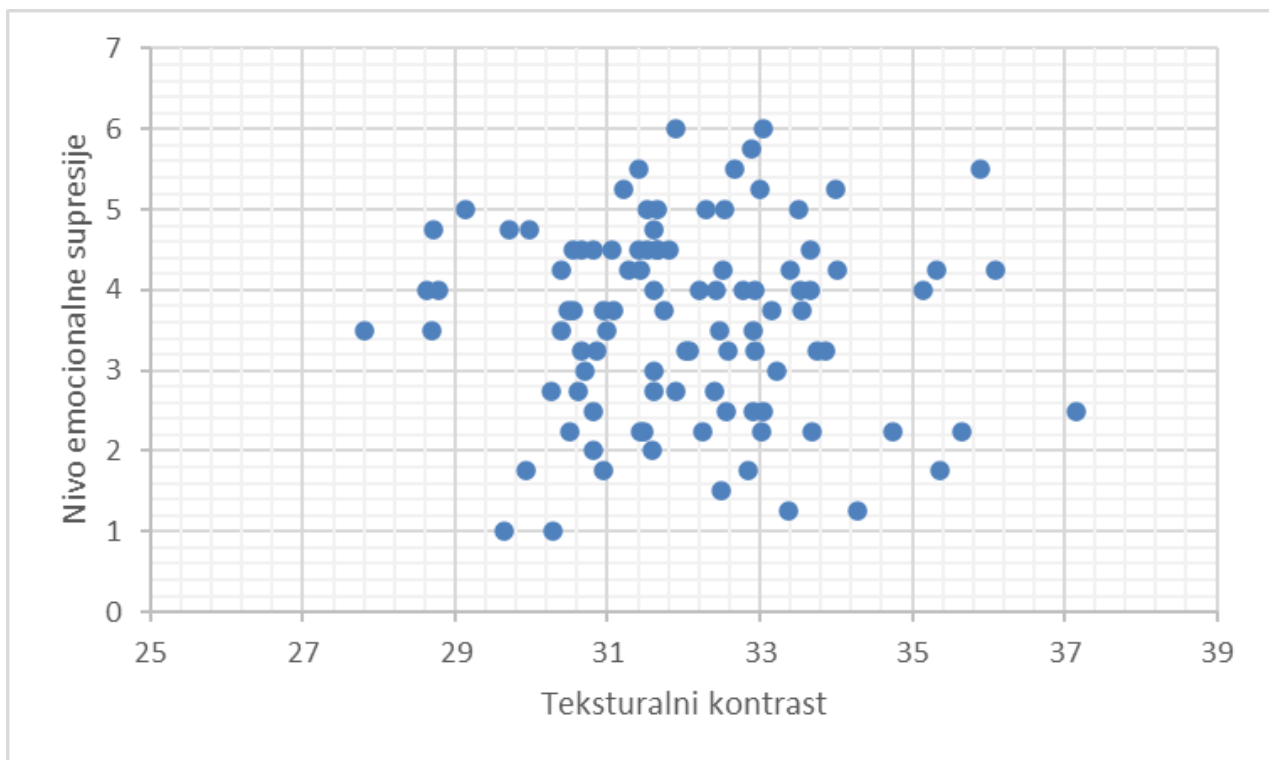
Grafikon 15. Plotovane vrednosti teksturalnog kontrasta jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi i skora za procenu generalizovane anksioznosti (GAD-7). Detektovana je statistički visoko značajna povezanost ($p < 0.01$).



Grafikon 16. Plotovane vrednosti teksturalne varijanse jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi i skora za procenu generalizovane anksioznosti (GAD-7). Nije detektovana statistički značajna povezanost ($p > 0.05$).



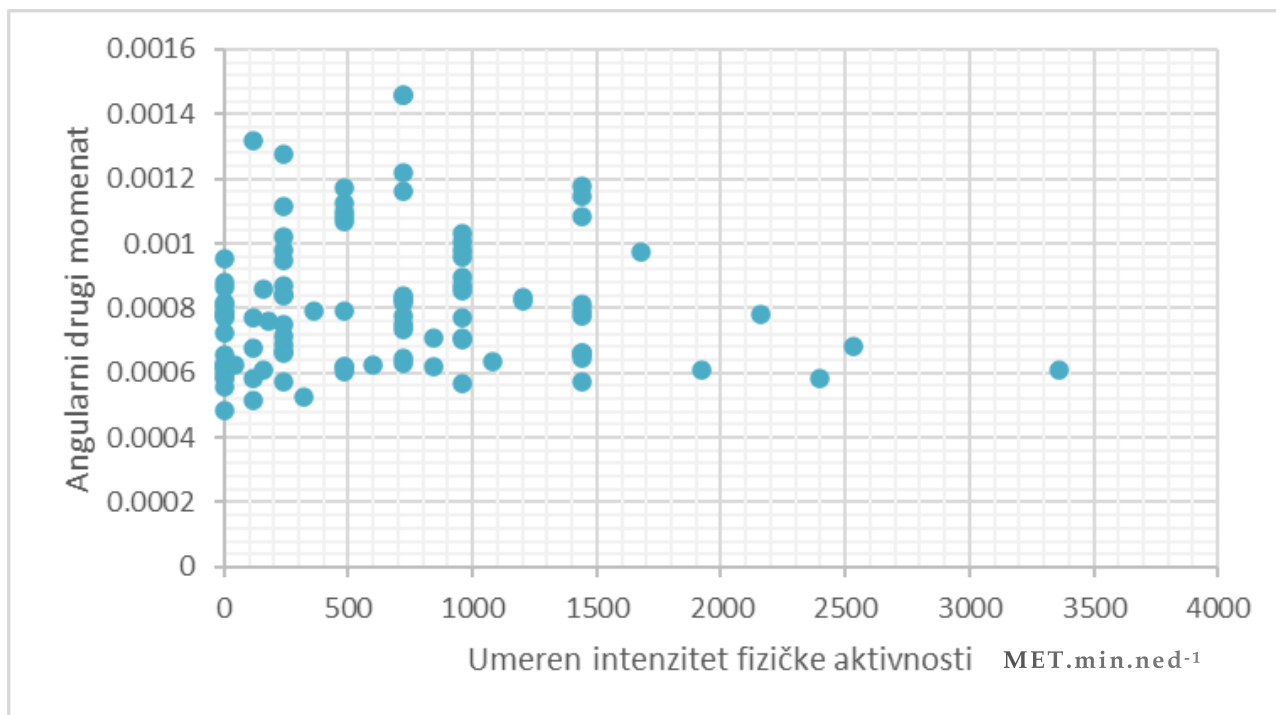
Grafikon 17. Plotovane vrednosti inverznog momenta razlike jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi i nivoa kognitivne preformulacije. Nije detektovana statistički značajna povezanost ($p > 0.05$).



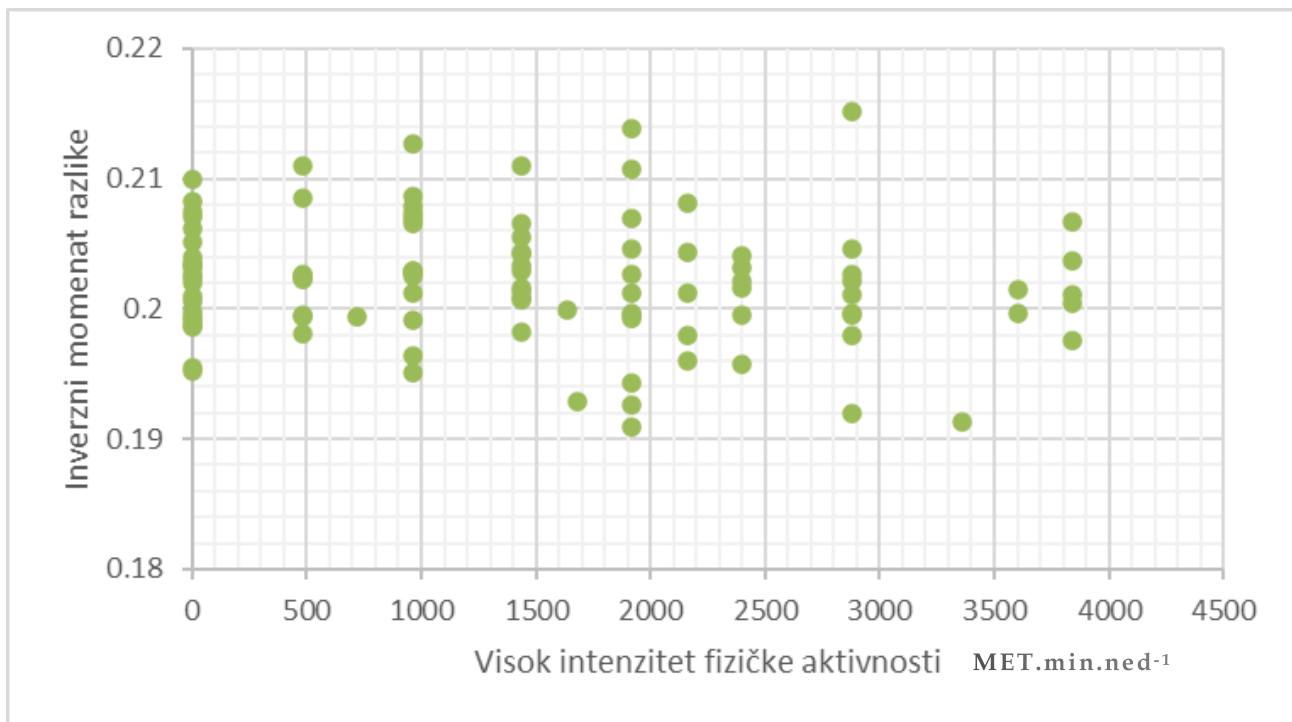
Grafikon 18. Plotovane vrednosti teksturalnog kontrasta jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi i nivoa emocionalne supresije. Nije detektovana statistički značajna povezanost ($p > 0.05$).

Kada su u pitanju rezultati vezani za emocionalnu regulaciju, nije utvrđena statistički značajna povezanost između nivoa kognitivne preformulacije i teksturalnih parametara jedarne strukture neutrofilnih granulocita. Ovo se odnosi kako na parametre homogenosti (angularni drugi momenat i inverzni momenat razlike) tako i na ostale GLCM indikatore (teksturalni kontrast, korelacija i varijansa). Slični rezultati su dobijeni i za povezanost emocionalne supresije sa teksturalnim indikatorima. Emocionalna supresija nije bila u statistički značajnoj korelaciji ni sa jednim GLCM indikatorom jedarne strukture neutrofilnih granulocita.

Intenzitet fizičke aktivnosti nije bio u statistički značajnoj korelaciji sa GLCM parametrima jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi. Nije detektovana statistički značajna povezanost između umerenog intenziteta fizičke aktivnosti i indikatora teksturalne homogenosti i uniformnosti jedra ($p > 0.05$). Takođe nije utvrđena statistički značajna povezanost između visokog intenziteta fizičke aktivnosti i parametara teksturalne homogenosti, kontrasta i varijanse hromatina neutrofilnih granulocita ($p > 0.05$).



Grafikon 19. Plotovane vrednosti angularnog drugog momenta jedarne strukture neutrofilnih granulocita i umerenog intenziteta fizičke aktivnosti.



Grafikon 20. Plotovane vrednosti inverznog momenta razlike jedarne strukture neutrofilnih granulocita i visokog intenziteta fizičke aktivnosti.

4.3. Model mašinskog učenja zasnovan na algoritmu „slučajnih šuma“

U ovom istraživanju predložili smo model mašinskog učenja zasnovan na regresor algoritmu „slučajnih šuma“ (*engl. „random forest regressor“*) koji ima potencijalnu primenu u predikciji anksioznosti i mentalnog stresa na osnovu GLCM indikatora jedarne strukture neutrofilnih granulocita periferne krvi. Model je napravljen u „Scikit-learn“ biblioteci koristeći Python programski jezik. Treniranje i testiranje modela je urađeno u okviru „Jupyter Notebook“ platforme kao deo „Google Colaboratory“ projekta.

```

from sklearn.ensemble import RandomForestRegressor
from sklearn.datasets import make_classification
from sklearn.model_selection import train_test_split
from sklearn import metrics
from sklearn.metrics import mean_squared_error, r2_score
from sklearn.metrics import RocCurveDisplay
from sklearn.model_selection import GridSearchCV
X= df[['asm', 'con', 'cor', 'idm', 'var' ]]
y = df['dass - s']
X_train, X_test, y_train, y_test = train_test_split(X, y, test_size=0.2)

rf = RandomForestRegressor(n_estimators=100, random_state=42)
rf.fit(X_train, y_train)

y_pred = rf.predict(X_test)
mse = mean_squared_error(y_test, y_pred)
r2 = r2_score(y_test, y_pred)

print(f"Mean squared error: {mse:.2f}")
print(f"R-squared score: {r2:.2f}")

```

Slika 5. Primer dela Python koda za treniranje i testiranje modela mašinskog učenja zasnovanog na algoritmu „slučajnih šuma“

Model je razvijen na osnovu RandomForestRegressor modula u Scikit-Learn biblioteci. Za razliku od klasifikatora kod kojeg je izlazna varijabla obično dihotomna, kod regresora, izlaz predstavlja varijablu na racionalnoj skali (u ovom slučaju skor). U našoj studiji su kao ulazni podaci korišćene vrednosti svih pet GLCM indikatora: angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, teksturalne korelacije, kontrasta i varijanse.

Od svih rezultata dobijenih ispitivanjem testova za procenu mentalnog distresa, model zasnovan na algoritmu „slučajnih šuma“ je pokazao najbolje performanse prilikom predviđanja nivoa anksioznosti kvantifikovanog GAD-7 testom. Utvrđeno je da ovaj model mašinskog učenja ima srednju kvadratnu grešku (engl. „mean squared error“- MSE) od 7.07 i R-kvadratni skor od 0.34. MSE meri prosečnu kvadratnu razliku između predviđenih vrednosti i realno izmerenih vrednosti. U ovom slučaju, vrednost MSE od 7.07 je ukazala na to da su predviđanja modela prosečno odstupila za 7.07 jedinica od stvarnih vrednosti. U našoj studiji, R-kvadratni skor je pokazao koliko dobro model odgovara podacima, sa vrednostima koje se kreću od 0 do 1. U ovom slučaju, R-kvadratni skor od 0.34 ukazuje na to da model objašnjava 34% varijabilnosti ciljne varijable. Ovo se često tumači kao „umerena“ performansa modela sa prostorom za buduće poboljšanje (npr. uz povećanje uzorka ili dodatnu hiperoptimizaciju parametara).

```

importances = rf.feature_importances_
indices = np.argsort(importances)[::-1]

# Print the feature ranking
print("Feature ranking:")

for f in range(X_train.shape[1]):
    print(f"{f+1}. {X_train.columns[indices[f]]} ({importances[indices[f]})")

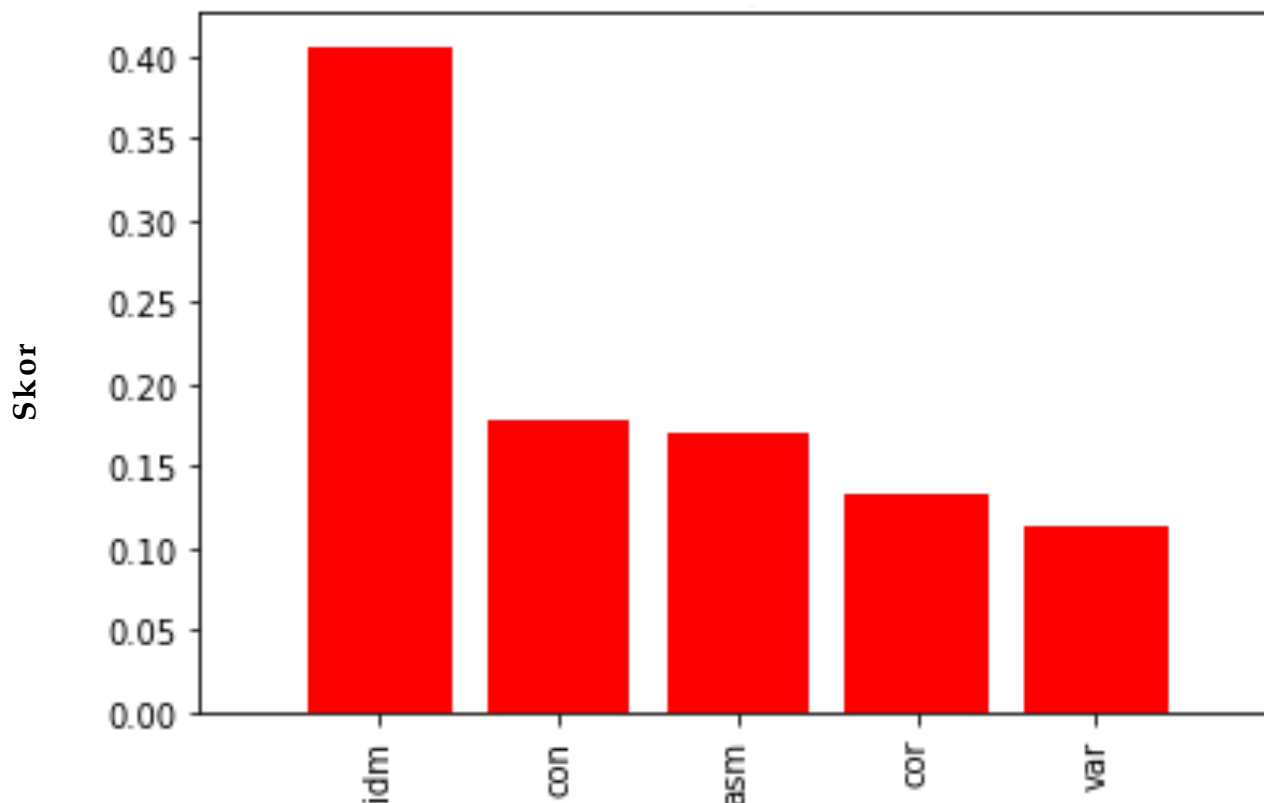
# Plot the feature importances of the forest
plt.figure()
plt.title("Feature importances")
plt.bar(range(X_train.shape[1]), importances[indices],
        color="r", align="center")
plt.xticks(range(X_train.shape[1]), X_train.columns[indices], rotation=90)
plt.xlim([-1, X_train.shape[1]])
plt.show()

```

Slika 6. Primer dela Python koda za utvrđivanje prediktorne vrednosti pojedinih ulaznih varijabli tokom stvaranja modela mašinskog učenja zasnovanog na algoritmu „slučajnih šuma“

Nakon utvrđivanja R-kvadratnog skora, izvršeno je rangiranje ulaznih varijabli prema njihovoj važnosti za performanse modela. Rezultati pokazuju da inverzni momenat razlike ima najveću važnost sa skorom od 0.406, zatim sledi teksturalni kontrast (0.177), angularni drugi momenat (0.170), teksturalna korelacija (0.133) i teksturalna varijansa sa najmanjim stepenom važnosti za funkcionisanje modela (0.114).

Značaj karakteristika



Grafikon 21. Rangiranje ulaznih varijabli prema njihovoj važnosti za performanse modela „slučajnih šuma“. (idm-inverzni momenat razlike; con-kontrast; asm-angularni drugi momenat; cor-korelacija; var-varijansa)

4.4. Model mašinskog učenja zasnovan na “Gradient Boosting” regresorskom algoritmu

Drugi hipotetički model mašinskog učenja koji predlažemo u cilju predikcije rezultata psiholoških testova je model zasnovan na takozvanom “Gradient Boosting” regresorskom (GBR) algoritmu. Ovaj model je razvijen takođe u okviru scikit-learn biblioteke za programski jezik Python korišćenjem „Gradient Boosting Regressor” modula. Hiperparametri ovog modela su definisani rečnikom „param_grid” a za potrebe našeg istraživanja korišćen je parametar “cv” koji definiše broj preklapanja koji su bili korišćeni tokom treninga. Slično modelu baziranom na algoritmu slučajnih šuma, GBR model je pokazao veliku sposobnost u predviđanju anksioznosti merene GAD-7 skorom na osnovu GLCM indikatora. I u okviru ove metode, kao ulazni podaci su korišćene vrednosti angularnog drugog momenta, inverznog momenta razlike, teksturalnoj kontrasta, teksturalne korelacije i GLCM varijanse.

Utvrđeno je da ovaj model mašinskog učenja ima srednju kvadratnu grešku od 135.6 i R-kvadratni skor od 0.29. Ovaj rezultat ukazuje da GBR ima znatno slabije performanse u odnosu na RF algoritam, ali takođe da ove performanse nisu zanemarljive i da ima puno mogućnosti za njihovo dodatno unapređenje (nakon povećanja uzorka i dodatne optimizacije hiperparametara).


```

from sklearn.ensemble import GradientBoostingRegressor
from sklearn.model_selection import GridSearchCV

# Define the hyperparameters to search over
param_grid = {'n_estimators': [50, 100, 200], 'max_depth': [2, 3, 4]}

# Create a GridSearchCV object to find the best hyperparameters
gbr = GridSearchCV(GradientBoostingRegressor(), param_grid, cv=5)
gbr.fit(X_train, y_train)

# Make predictions on the test set
y_pred = gbr.predict(X_test)

# Compute the metrics
mse = mean_squared_error(y_test, y_pred)
r2 = r2_score(y_test, y_pred)

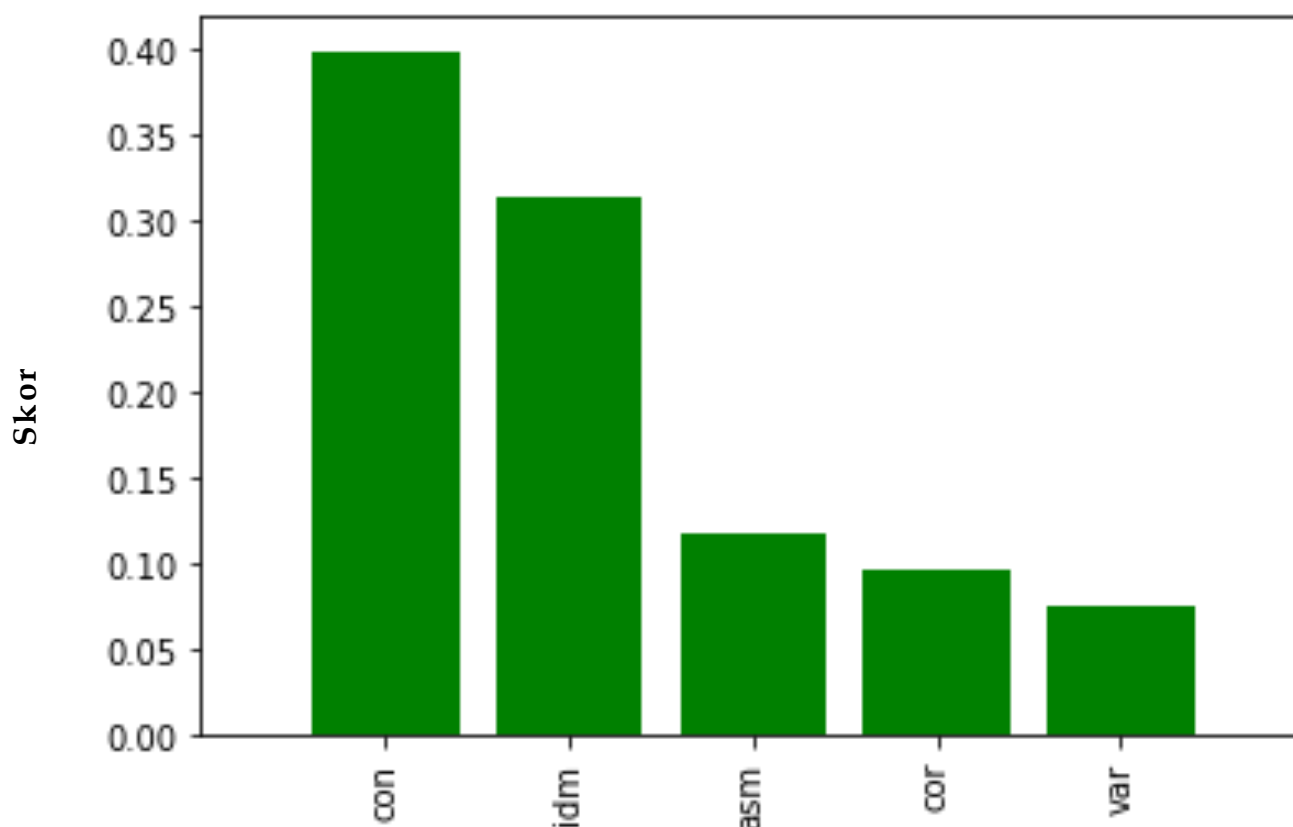
print(f"Mean squared error: {mse:.2f}")
print(f"R-squared score: {r2:.2f}")

```

Slika 7. Primer dela Python koda u „Scikit-Learn“ biblioteci za treniranje i testiranje modela mašinskog učenja zasnovanog na “Gradient Boosting” regresorskom algoritmu.

Nakon utvrđivanja R-kvadratnog skora, slično kao kod RF modela, izvršeno je rangiranje ulaznih varijabli prema njihovoj važnosti za performanse modela. Rezultati pokazuju da teksturalni kontrast ima najveću važnost sa skorom od 0.40, zatim sledi inverzni momenat razlike (0.312), angularni drugi momenat (0.121), teksturalna korelacija (0.096) i teksturalna varijansa sa najmanjim stepenom važnosti za funkcionisanje modela (0.075).

Značaj karakteristika



Grafikon 22. Rangiranje ulaznih varijabli prema njihovoj važnosti za performanse "Gradient Boosting" modela. (con-kontrast;idm-inverzni momenat razlike; asm-angularni drugi momenat; cor-korelacija; var-varijansa)

4.5. Model mašinskog učenja zasnovan na "Support Vector Machine" regresorskom algoritmu

Treći hipotetički model mašinskog učenja koji je predložen na osnovu naših rezultata odnosi se na algoritam regresora mašine sa potpornim vektorima (engl. „Support Vector machine Regressor“, SVR). Ovaj algoritam se zasniva na konceptu potpornih vektora i postavljanju odgovarajućih margina u podacima kako bi se pronašla takozvana „hiperravnina“ u prostoru visoke dimenzije koja najbolje odgovara skupu podataka. Cilj SVR algoritma je minimizirati grešku predikcije i maksimizirati marginu između hiperravnine i najbližih primera iz skupa podataka. U našem istraživanju opredelili smo se za modul SVR u okviru biblioteke Scikit-Learn u cilju stvaranja instance SVR modela. Uz pomoć „GridSearchCV“ uradili smo pretragu mreže hiperparametara radi utvrđivanja najbolje kombinacije za predloženi SVR model. Pored ostalog, koristili smo model sa radijalnom baznom funkcijom (RBF), kernelom i hiperparametarskom mrežom. Nakon treniranja i testiranja, utvrđeno je da ovaj model mašinskog učenja ima srednju kvadratnu grešku od 192.3 i R-kvadratni skor od 0.05. Ovaj rezultat sugeriše da SVR model ima veoma slabe performanse i da nije efikasan u predikciji anksioznosti, mentalnog distresa i ostalih psiholoških parametara.

```

from sklearn.svm import SVR
from sklearn.model_selection import GridSearchCV

# Define the hyperparameters to search over
param_grid = {'C': [0.1, 1, 10], 'epsilon': [0.1, 0.01, 0.001]}

# Create a GridSearchCV object to find the best hyperparameters
svr = GridSearchCV(SVR(kernel='rbf'), param_grid, cv=5)
svr.fit(X_train, y_train)

# Make predictions on the test set
y_pred = svr.predict(X_test)

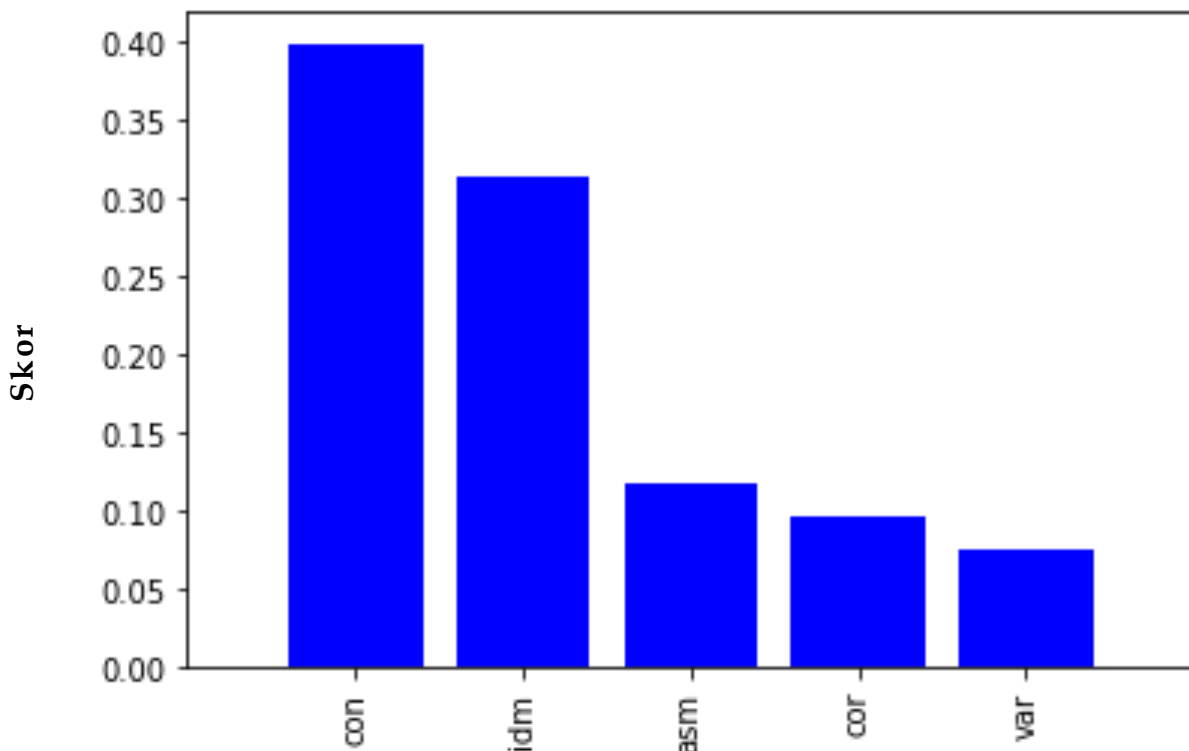
# Compute the metrics
mse = mean_squared_error(y_test, y_pred)
r2 = r2_score(y_test, y_pred)

print(f"Mean squared error: {mse:.2f}")
print(f"R-squared score: {r2:.2f}")

```

Slika 8. Primer dela Python koda u „Scikit-Learn“ biblioteci za treniranje i testiranje modela mašinskog učenja zasnovanog na „Support Vector machine Regressor“ algoritmu.

Značaj karakteristika



Grafikon 23. Rangiranje ulaznih varijabli prema njihovoj važnosti za performanse „Support Vector Machine Regressor“ modela. (con-kontrast; idm-inverzni momenat razlike; asm-angularni drugi momenat; cor-korelacija; var-varijansa)

5. DISKUSIJA

Kroz istoriju, višestruko je naglašavan značaj fizičke aktivnosti, redovnog vežbanja i fizičke kondicije. Prvi naučni podaci koji ukazuju na beneficijalne efekte fizičke aktivnosti po zdravlje, datiraju od kraja XIX i početka XX veka i prate razvojnu ekspanziju epidemioloških studija (Health and exercise, 1886; Loomis, 1889; Weber, 1918). Tako je, prema rezultatima jedne od prvih, opservacionih epidemioloških studija, pokazano da su fizički neaktivne osobe u većoj stopi oboljevale od koronarne bolesti u odnosu na pojedince koji su vodili aktivni životni stil (Morris et al., 1953). Spisak bolesti koje su povezane sa fizičkom neaktivnošću i sedanternim načinom života je vremenom bivao sve veći, a najznačajnija negativni uticaj je definisan u aspektu povezanosti sa rastućom prevalencom gojaznosti, kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa tipa 2, metaboličkog sindroma, insulinske rezistencije, hiperlipidemije, malignih oboljenja, ali i u aspektu mentalnih bolesti poput depresije i anksioznosti. Fizička neaktivnost se vodi kao četvrti doprinoseći etiološki faktor za nastanak smrti, na globalnom nivou (Dyreson and Schultz, 2021).

Navedene hronične nezarazne bolesti, u osnovi, kao zajedničku karakteristiku imaju povezanost sa hroničnim stresom odnosno disregulaciju u integraciji neuroendokrinog, inflamatornog, metaboličkog i biheviornog odgovora na stres (O'Connor et al., 2021). Za razliku od fizičke neaktivnosti, aktivan stil života, izražen kroz različite stepene intenziteta fizičke aktivnosti, je obrnuto proporcionalan stopama zdravstvenih problema povezanih sa stresom i razvojem hroničnih bolesti. Značajno je istaći da, fizička spremnost, postignuta bilo dnevnom fizičkom aktivnošću ili redovnim i usmerenim vežbanjem, povećava tzv. „rezilijentnost“, koja se definiše kao sposobnost da se izdrži, oporavi i napreduje prilikom suočenosti sa stresorima i promenljivim zahtevima homeostaze. Homeostatski sistemi u okviru kojih redovna fizička aktivnost povećava rezilijentost uključuju: neuroendokrini (u smeru uspostavljanja balansiranog hormonskog odgovora na razne stresore), inflamatorni (stimulisanje anti-inflamatornog odgovora), povećanje neuroplastičnosti i ekspresije različitih faktora rasta. Navedeni sistemi su funkcionalno integrisani pa se promene unutar jednog, vrlo često odražavaju u funkciji drugog sistema. Tako, u zavisnosti od intenziteta i trajanja fizičke aktivnosti, razlikujemo oscilacije u nivoima kortizola i posledično, promene u funkcionisanju imunskog sistema bilo u smeru npr. povećanja migratorne aktivnosti neutrofilnih granulocita i monocita, ili paradoksalno, supresije pojedinih komponenti imunskog sistema (Kim et al., 2019).

U našoj studiji je učestvovalo 100 zdravih sportista studenata Medicinskog fakulteta u Beogradu. Ispitanicima su pre popunjavanja upitnika za procenu mentalnog distresa odrađena antropometrijska merenja. Rezultati antropometrijskih merenja koje smo dobili pokazuju značajne sličnosti sa podacima istraživanja koje su sprovedeli Zaccagni i saradnici (Zaccagni et al., 2014). Naime, oni su ispitivali povezanost antropometrijskih parametara i intenziteta fizičke aktivnosti kod studenata Italijanskih univerziteta, i ukazali su da aktivan način života, uključujući redovnu nedeljnu fizičku aktivnost, u značajnoj korelaciji sa parametrima telesne kompozicije.

Rezultati naše studije su u saglasnosti sa rezultatima ove studije, gde je naglašeno da nedeljni intenzitet fizičke aktivnosti ima uticaj kod ispitanika muškog pola na smanjenje procenta masti, dok su žene pokazivale povećanje procenta mišića, što bi se moglo objasniti polnom sklonošću ka održavanju energetske ravnoteže u organizmu, ili bavljenjem različitim sportskim aktivnostima. Pored ove naučne studije, značajno je napomenuti i studiju sprovedenu od strane Savengnago i saradnika (Savengnago et al., 2014). Ova studija je ispitivala zdravstvene navike Univerzitetskih studenata na osnovu kojih su identifikovali telesnu kompoziciju i intenzitet fizičke aktivnosti studenata. Analizom rezultata ove studije je otrivena visoka prevalencija niskog intenziteta fizičke aktivnosti, povezana sa visokim procentom telesne masti čak i među pojedincima čiji je BMI bio u normalnom opsegu. Naši ispitanici su se, prema referentnim vrednostima iz gore navedenog istraživanja, uklapali u opseg sa studentima istog pola i intenziteta fizičke aktivnosti po vrednostima parametara telesne kompozicije.

Upoređivanjem razlika dobijenih analizom antropometrijskih parametara, u našoj studiji su zabeležene statistički visoko značajne razlike između svih antropometrijskih parametara ispitanika muškog i ženskog pola. Vrednosti telesne visine, telesne mase, BMI i procenta telesnih mišića bile su statistički značajno veće u grupi ispitanika muškog pola. Sa druge strane, kod ispitanika ženskog pola, procenat telesnih masti bio je statistički značajno veći. Razlike u vrednostima antropometrijskih parametara između sportista i sportistkinja su prvenstveno posledica bioloških polnih razlika u telesnoj kompoziciji, hormonalnih profila i fizioloških adaptacija na trening (Giagulli et al., 2019; Santos et al., 2014).

Procenat ukupnih telesnih masti ima tendenciju da bude veći kod žena nego kod muškaraca zbog razlika u polnim hormonima, kao i zbog razlike u procentu esencijalnih masti koji postoji kod polova. Estrogen, primarni ženski polni hormon, podstiče taloženje i skladištenje masti, posebno u dojkama, bokovima i butinama, što dovodi do većeg udela telesne masti kod žena (Grantham and Henneberg, 2014). Nasuprot tome, testosteron, kao primarni muški polni hormon, podstiče razvoj nemasne telesne mase i smanjuje skladištenje masti u telu, što dovodi do nižeg udela telesne masti u strukturi tela kod muškaraca (Fink et al., 2018). Procenat esencijalnih masti kod osoba muškog pola iznosi 3 - 6%, a kod osoba ženskog pola ovaj procent se kreće između 9 i 14%. Procenat ukupnih telesnih masti koje su neophodne za adekvatnu ćelijsku komunikaciju, sintezu steroidnih hormona, sintezu i skladištenje vitamina, zaštitu vitalnih abdominalnih organa, kao i termičku izolaciju tela, predstavljaju esencijalne masti (Spector and Kim, 2015).

Osim na procenat telesnih masti, i objašnjenje statistički značajne razlike u procentu mišića između ispitanika ženskog i muškog pola se može objasniti zbog različitog uticaja polnih hormona, pri čemu muškarci imaju veću mišićnu masu i snagu od žena. Ovo je posledica razlike u nivoima testosterona, koji promovisu mišićnu hipertrofiju i povećanje snage (Fink et al., 2018).

Takođe, i drugi faktori, kao što su razlike u tipu mišićnih vlakana i arhitekturi, mogu doprineti polnim razlikama u mišićnoj masi i snazi (Staron et al., 2000).

Telesna masa i BMI se takođe razlikuju između sportista muškog i ženskog pola, pri čemu muškarci generalno imaju veću telesnu masu i imaju veće vrednosti BMI od žena. Ovo je delimično zbog razlika u telesnoj kompoziciji, pri čemu muškarci obično imaju više mišićne mase i veću gustinu kostiju od žena (Giagulli et al., 2019). Međutim, upotreba BMI kao mere telesne kompozicije je ograničena, jer ne pravi razliku između nemasne telesne mase i masne mase (Mulasi et al., 2015).

Pored bioloških polnih razlika, na antropometrijske razlike između sportista i sportistkinja mogu uticati i faktori treninga. Na primer, sportisti muškog i ženskog pola mogu imati različite ciljeve i metode treninga, što može uticati na njihov telesni sastav i fizičke performanse (Wohlgemuth et al., 2021). Pored toga, polno specifični odgovori na trening, kao što su razlike u mišićnoj hipertrofiji i povećanju snage, mogu doprineti već postojećim polnim razlikama u antropometrijskim merama što je pokazano u studiji Robersta i saradnika (Roberts et al., 2020). Sumarno, uticaj polnih hormona, razlika u tipu mišićnih vlakana, specifični faktori treninga utiču na nekoliko antropometrijskih mera, uključujući ukupan procenat telesnih masti, procenat telesnih mišića, telesnu masu i BMI. Rezultati koje smo dobili u našoj studiji su potpuno u saglasnosti sa rezultatima istraživanja u radu Bredella iz 2017. godine, koje je analiziralo uzroke različitog procenta i rasporeda telesnih masti i telesnih mišića kod osoba muškog i ženskog pola (Bredella, 2017).

Na osnovu analize skorova za intenzitet fizičke aktivnosti i skala mentalnog distresa kroz 3 upitnika, nismo dobili statistički značajnu korelaciju niti povezanost različitih intenziteta FA i mentalnog distresa.

Prva korelacija koju smo statistički ispitivali je povezanost umerene i visoko intenzivne FA i parametara emocionalne regulacije (emocionalna supresija i kognitivna preformulacija). Emocionalna regulacija ima ulogu da moduliše kvalitet, intenzitet i vremenski tok iskustva doživljenih emocija (Gross and Thompson, 2007). Zahvaljujući emocionalnoj regulaciji možemo modulirati stepen uticaja stimulusa koji su odgovorni za izazivanje emocija, usmeravati pažnju ka (ili daleko) od njih, proceniti situacije opterećene emocijama ili inhibirati obrasce ponašanja koji se javljaju uz takve emocije. Regulacija emocionalnog odgovora može biti slučajna i namerna, i delovati u bilo kojoj tački od nastanka emocije do ispoljavanja obrasca ponašanja koji prati tu emociju. Može ići u različitim smerovima i podsticati ili prigušivati pozitivne ili negativne emocije. Emocionalna regulacija igra značajnu ulogu u društvenim interakcijama, kognitivnom funkcionisanju, samokontroli, mentalnom zdravlju i blagostanju pojedinca (Gross, 2015; Braunstein et al., 2017). Ali, ne treba zaboraviti i ulogu emocionalne regulacije u fizičkoj aktivnosti i treningu.

Pojedinci prilikom treninga koriste različite asocijativne i disocijativne kognitivne tehnike (npr. razgovor sa samim sobom, distrakcija, vizualizacija i samobodrenje) koje mogu biti podsticajne i povećati toleranciju na stresore tako što će ublažiti negativne efekte fizičkog napora. Navedene kognitivne tehnike su zapravo strategije emocionalne regulacije (Bernstein and Mc Nally, 2017). Prema nekim autorima se smatra da redovna fizička aktivnost zapravo ojačava mehanizme emocionalne regulacije i može da olakša adaptaciju u kontekstu emocionalnog odgovora za suočavanje sa drugim stresorima koji čak nisu povezani sa vežbanjem (Oaten and Cheng, 2006; Bernstein et al., 2017). Rezultati naše studije se razlikuju od rezultata istraživanja Wang i saradnika. Oni su u svom radu ispitivali stepen emocionalne regulacije i njenu povezanost sa intenzitetom fizičke aktivnosti kod univerzitetskih studenata (Wang et al., 2022). Rezultati ove naučne studije na 826 studenata su ukazali na to da je postojala statistički značajna povezanost između intenziteta fizičke aktivnosti i stepena emocionalne regulacije. Naime, dokazali su da je intenzivnija fizička aktivnost u pozitivnoj korelaciji sa boljom emocionalnom regulacijom kako pozitivnih, tako i negativnih emocija. Druga naučna studija, Wu-a i saradnika koja je urađena na uzorku od 60 studenata određivala je povezanost između: stepena fizičke aktivnosti, emocionalne regulacije i debljine kore velikog mozga (Wu et al., 2022). Oni su, istovetno našim rezultatima, pokazali da nije bilo povezanosti između različitih intenziteta (nizak, umeren, visok) fizičke aktivnosti i parametara emocionalne regulacije, ali da je debljina kore velikog mozga značajno korelirala sa višim intenzitetom fizičke aktivnosti. Detaljnijim ispitivanjima, autori su otkrili da je zadebljanje kore bilo značajno u regionu desnog rostralnog prednjeg cingularnog korteksa koji ima značajnu ulogu u nagrađivanju/kazni i integraciji emocije sa obrascima ponašanja. Stoga, za procenu emocionalne regulacije možda treba sprovesti još neku metodu evaluacije pored upitnika, u smeru kako morfoloških, tako i funkcionalnih ispitivanja. Zbog toga što je veći deo funkcionalnog i strukturnog razvoja mozga završen u ranom adultnom periodu, efekat fizičke aktivnosti, kao i dužina sportskog staža na različite psihološke parametre kod zdravih odraslih osoba mogu predstavljati značajan predmet budućih naučnih istraživanja.

Nakon procene međusobne povezanosti različitih intenziteta FA i emocionalne regulacije kod ispitanika je sprovedena analiza GAD-7 upitnika za ispitivanje generalizovane anksioznosti i njena povezanost sa intenzitetom FA. Anksioznost je u današnje vreme izuzetno čest problem kod mladih ljudi širom sveta (Jefferies and Ungar, 2020). Karakteriše se neurovegetativnim simptomima koji podrazumevaju: razdražljivost, nervozu i preteranu zabrinutost, drhtanje ruku, stezanje u grudima, lupanje srca itd. Prema nekim procenama 33,7% ljudi tokom života bude pogođeno nekom formom anksioznih poremećaja (Steel et al., 2014). Posebno se izdvaja značaj anksioznosti kod populacije studenata jer su oni pod višestrukim pritiskom i to - akademskim (prijemni ispiti/provere znanja i ispiti tokom osnovnih studija), do skora i pandemijskim, ali i socijalnim stresovima kao što su neizvesna budućnost nakon završetka studija itd.

Studenti sa anksioznošću imaju nedostatak entuzijazma za učenje i život, poteškoće sa spavanjem i u težim slučajevima, čak i automutilističke obrasce ponašanja koji mogu voditi u suicid (Liu et al., 2019). Prema teoriji socijalnog povlačenja značajno smanjenje fizičke aktivnosti kod adolescenata koji su isključeni iz grupnih aktivnosti vodi u poremećaje poput anksioznosti i depresije (Anderson and Brice, 2011). Stoga, bavljenje fizičkom aktivnošću, prema rezultatima brojnih studija, pogotovu u populaciji studenata pokazuje pozitivan uticaj na mentalno zdravlje (McMahon et al., 2017). Rezultati naše studije su pokazali da nije bilo značajne povezanosti između GAD-7 skora i stepena fizičke aktivnosti. Rezultati naše studije se razlikuju od rezultata drugih autora koji su istraživali povezanost fizičke aktivnosti i anksioznosti. Tian i saradnici su među populacijom od 1153 studenata ispitivali korelaciju između intenziteta fizičke aktivnosti i procene anksioznosti (Tian and Austin, 2022). Najveći broj ispitanika je imao umerenu i visoko intenzivnu fizičku aktivnost, a rezultati ove naučne studije su pokazali da je kod ispitanika koji su imali veći intenzitet fizičke aktivnosti dokazan manji stepen anksioznosti, a takođe je procenjen i veći stepen blagostanja. Pandemija COVID-19 je u poslednje 3 godine umnogome doprinela razvoju anksioznosti u celokupnoj populaciji, pa se često oko nje centralizuju istraživanja ovog tipa. Levandovska i saradnici su kod 506 mladih ispitanika između 18 - 34 godina evaluirali stepene fizičke aktivnosti i GAD-7 skor u dve vremenske tačke - nedelju dana pre i posle prvog „zaključavanja“ tokom pandemije COVID-19 (Lewandowska et al., 2022). Zabeležen je značajan pad u intenzitetu fizičke aktivnosti kod ispitanika nakon „zaključavanja“ i porast sedanterno provedenog vremena. Pored ovoga, došlo je i do značajne inverzije u vrednostima GAD-7 skora prema kojima je nakon smanjenja fizičke aktivnosti došlo do značajnog porasta u stopama anksioznosti kod ispitanika. U svom istraživanju, Ji i saradnici su obuhvatili 84 studenta, i dokazali su da intenzitet, kao i učestalost fizičke aktivnosti značajno smanjuju stepen anksioznosti (Ji et al., 2022). U ovom istraživanju je utvrđeno da na stepen anksioznosti veći uticaj ima intenzitet fizičke aktivnosti, od učestalosti fizičke aktivnosti. U ovoj, kao i u prethodno navedenim studijama, dobijeno je da postoji negativna korelacija između stepena fizičke aktivnosti i GAD-7 skora, što nije u saglasnosti sa dobijenim rezultatima u našoj studiji. Potencijalno objašnjenje zašto naši rezultati odstupaju od rezultata prethodno navedenih studija je u tome što je studija sprovedena u periodu kada su epidemiološke mere bile manje represivne, pa je kod ispitanika stepen blagostanja bio verovatno veći, a samim tim i nivo anksioznosti manji, a takođe, naša studija je obuhvatila samo ispitanike koji su se bavili sportom, a ne celu populaciju studenata, što je bio slučaj u prethodnim studijama.

Sledeći upitnik koji je analiziran u sklopi studije je i DASS-21 koji je služio za procenu depresivnosti, anksioznosti i stresa kod ispitanika. Depresija se definiše kao poremećaj ponašanja, kod koga može postojati nisko samopoštovanje, stalni osećaj krivice, gubitak zadovoljstva i motivacije, nedostatak interesovanja, razdražljivost ili tuga, poremećaji spavanja, nedostatak apetita, teškoće u koncentrisanju i gubitak energije. Depresija se smatra multidimenzionalnim poremećajem, i može se predstaviti kao negativna afektivnost sa značajnim uticajem na mentalno blagostanje

(McAllister-Williams et al., 2020). Stres se, s druge strane, definiše kao psihičko ili fizičko opterećenje koje je povezano sa mogućim osećajem ranjivosti, i može, između ostalog, dovesti do različitih mentalnih poremećaja i ugroziti emocionalno blagostanje individue. U literaturi se stres definiše kao pojava koja se javlja kada postoji neravnoteža između nekog zahteva (fizičkog i/ili psihičkog), koji se nameće osobi i reagovanje osobe na taj zahtev (O Connor et al., 2021). Sa psihološke tačke gledišta fizička aktivnost može smanjiti nivo mentalnog stresa. Međutim, kada govorimo o elitnim sportistima, rutina fizičkog vežbanja može značajno povećati mentalni stres. Fizička aktivnost takođe može prevenirati ili ublažiti simptome depresije stimulisanjem niza neuroplastičnih procesa, smanjenjem inflamacije i povećanjem otpornosti na oksidativni i psihološki stres. Vežbe koje su planirane, strukturirane i repetitivne sa specifičnim ciljem, dovode do ublaženja simptoma kod ljudi sa stresom i anksioznošću. Međutim, treba navesti i da vežbanje može biti povezano i sa negativnim efektima na zdravlje, kao što je mogućnost za nastanak povreda i razvoj poremećaja u ishrani što dalje može voditi u poremećaje mentalnog zdravlja. Zbog povećanih zahteva, kod vrhunskih sportista se nakon povreda češće razvija depresija (Bryan et al., 2019). Rezultati naše studije nisu dokazali statistički značajnu povezanost između umerenog i visokog intenziteta fizičke aktivnosti i DASS-21 skora. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa studijom sprovedenom od strane Talapka i saradnika, u kojoj je učestvovalo 823 studenata, i gde je pokazano da su se intenzitet fizičke aktivnosti direktno odražava na skorove depresivnosti, anksioznosti i stresa (Talapka et al., 2021). Studenti koji su bili fizički neaktivni su imali više skorove depresivnosti, anksioznosti i stresa, dok su studenti koji su na nedeljnom novou upražnjavali umerenu ili visoko intenzivnu fizičku aktivnost imali niže DASS-21 skorove. U navedenoj studiji je pokazano da je najvišu vrednost DASS-21 skora imala populacija studenata završne godine, češće osobe ženskog pola, kao i da je parametar za skorovanje anksioznosti bio najviše izražen. Takođe, naši rezultati nisu u saglasnosti sa studijom Zhanga i saradnika iz 2022. godine, u kojoj je na 1117 studenata dokazano da viši intenziteti fizičke aktivnosti imaju negativnu statističku povezanost sa DASS-21 skorom (Zhang et al., 2022). U ovoj studiji, dokazano je da tolerancija na vežbanje i visoko intenzivnu fizičku aktivnost koju su definisali kao sposobnost da se kontinuirano izvršavaju planovi vežbanja uprkos intenzitetu vežbanja iznad fiziološkog praga čak i kada se aktivnost doživljava kao neprijatna/neudobna, može značajno unaprediti mentalnu otpornost u suočavanju i tolerisanju depresije, stresa i anksioznosti (Zhang et al., 2022). Studija koja se delimično slaže sa našim rezultatima je studija Vaughan i saradnika, koji su ispitali stepen depresivnosti, anksioznosti i stresa u grupi vrhunskih sportista, amatera i ljudi koji se ne bave sportom (Vaughan et al., 2020). Oni su pokazali da je kod vrhunskih sportista veći skor depresivnosti u odnosu na obe grupe, ali značajno manji skor anksioznosti i stresa nego kod pojedinaca koji se ne bave sportom. U osnovi razlika u DASS-21 skor u navedenim studijama može biti tzv. „sindrom izgaranja“. „Sindrom izgaranja“, bez obzira na kontekst, predstavlja hroničnu manifestaciju stresa, i biva praćen drugim poremećajima mentalnog zdravlja (Raedeke and Smith, 2001; Gustafsson et al., 2018).

Istraživanja sugeriraju da je izgaranje kod vrhunskih sportista i mentalno zdravlje (na primer, depresija i anksioznost) u visokoj korelaciji. Takođe, depresija može biti uobičajeni ishod izagaranja kod sportista (De Francisco et al., 2016). Naši rezultati se potencijalno mogu objasniti kompleksnim zajedničkim uticajem zahteva sportova u kojem su se ispitanici takmičili i akademskim zahtevima koje su morali uspešno da ostvare.

U našoj studiji, nisu pronađene statistički značajne razlike u korelaciji umerenog i visokog intenziteta fizičke aktivnosti i strukturne organizacije neutrofilnih granulocita analizirane pomoću GLCM metode teksturalne analize, iako je u kasnije navedenim naučnim istraživanjima dokazano da su različiti intenziteti fizičke aktivnosti u korelaciji sa promenama u funkciji ćelija imunskog sistema. Sagledaćemo rezultate dobijene tim studijama, a onda ćemo pokušati da analiziramo razloge zbog kojih naša studija nije u homologiji sa njihovim istraživanjima. Svakako, značajno je naglasiti da je naša studija prva koja je proučavala strukturne, a ne funkcionalne promene neutrofilnih granulocita, na specifičnom uzorku sportista. S toga su analize i rezultati dobijeni u napred navedenim studijama samo delimično uporedivi sa našim.

U poslednjih 20 godina dvadesetog veka, dokumentovan je značajan broj naučnih rezultata koji dokazuje pozitivan uticaj vežbanja na imuni sistem (Forte et al., 2022; Bigley et al., 2014). Zaista, fizička aktivnost se sve češće primenjuje u prevenciji i terapiji ne samo infektivnih i inflamatornih bolesti i velikog broja karcinoma poput karcinom kolona, prostate, pluća i drugih, već čak i bolesti koje uključuju poremećeno funkcionisanje imunog sistema kao što su autoimuni i/ili autoinflamatorni poremećaji (Pedersen and Saltin, 2015).

Iako vežbanje snažno modulira sve aspekte imunološkog odgovora, ovo je posebno važno u modulaciji urođenog/inflamatornog odgovora. U ovom momentu, i pored velikog broja naučnih studija, još uvek nije u potpunosti poznato koji je optimalan nivo FA koji poboljšava, ali ne narušava ili preterano stimuliše zdravu urođenu imunološku funkciju. To je verovatno zato što će optimalni nivo zavistiti od fizioloških prilagođavanja svakog pojedinca vežbanju. Fizička aktivnost (i umerena i intenzivna) je fiziološki stresor, a njeni efekti na inflamatorne odgovore su uglavnom posredovani promenama u simpatičkom nervnom sistemu (SNS) i/ili hipotalamus-hipofizno-nadbubrežnoj (HHN) osovini (Husband, 2020).

Pokazano da, tokom umerene ili visoko intenzivne fizičke aktivnosti koja traje kraće od 60 minuta, dolazi do: stimulisanja fagocitne sposobnosti tkivnih makrofaga, povećane recirkulacije imunoglobulina, antiinflamatornih citokina, neutrofila, NK ćelija, citotoksičnih T i nezrelih B limfocita (Bigley and Simpson, 2015). S obzirom na to da su, prilikom fizičkog napora većeg intenziteta, mišićna vlakna u intenzivnom metabolizmu, novonastali otpadni produkti mogu oštetiti ćelije pri čemu se razvija inflamacija. Prilikom kratkotrajne umerene fizičke aktivnosti prvenstveno se mobilišu NK ćelije i CD8⁺ T limfociti koji imaju citotoksični efekat i veliki migratorni potencijal.

Hormoni stresa, koji mogu suprimirati funkciju imunskih ćelija, i proinflammatorni citokini, koji su indikatori intenzivne metaboličke aktivnosti, ne dostižu dovoljno visoke nivoe tokom umerene do visoko intenzivne fizičke aktivnosti kratkog trajanja. Vremenom, ove prolazne, vežbanjem izazvane promene u brojnosti različitih subpopulacija limfocita dovode do poboljšanja imunološke funkcije i redukcije inflamacije (Adams et al., 2011; Bigley et al., 2014; Gupta et al., 2018; Nieman et al., 2005). Bitno je napomenuti i da umerena fizička aktivnost dovodi do blagih i kratkotrajnih povećanja IL-6 koji pored antiinflammatornih efekata, dovodi i do poboljšanja u metabolizmu glukoze i lipida tokom vremena (Kartstoft and Pedersen, 2016; Pedersen, 2017).

Tranzitorna imunska disfunkcija je entitet koji je prema rezultatima nekih istraživanja udružena sa kratkotrajnom visoko intenzivnom fizičkom aktivnošću (Campbell and Turner, 2018). Međutim, revizijom literaturnih podataka, otkriveno je da stepen imunosupresije zapravo ne zavisi od intenziteta fizičke aktivnosti već od količine stresa koju pojedinac doživljava prilikom bavljenja visoko intenzivnom fizičkom aktivnošću (Campbell and Turner, 2018). U radu Nimana i saradnika pokazano je da kod sportista koji intenzivno vežbaju više od 2 h, dolazi do značajnog povećanja koncentracije više od 300 metabolita što ukazuje na to da su zalihe glikogena potrošene i da se aktiviraju drugi metabolički putevi u cilju obezbeđivanja adekvatnog energetskog bilansa (Nieman et al., 2018a). Jedna od jedinjenja koje se tom prilikom stvaraju su i oksilipini. Oksilipini predstavljaju heterogenu grupu jedinjenja koji nastaju kao posledica oksidacije masnih kiselina i njihovi efekti su mnogostruki. Pre svega, oni zajedno sa ćelijama urođene imunosti u oštećenom mišićnom tkivu iniciraju i regulišu tok same inflamacije (Markworth et al., 2016; Nieman et al., 2013; Nieman et al., 2018b). Pored oksilipina, otkriven je veliki broj različitih molekula koje proizvode imunske ćelije, a regulišu tok inflamacije, poput: lizozima C, neutrofilne elastaze, defenzina 1, proteina S100-A8/A12, katelicidina, α -aktinina-1, profilina-1, serumskog amiloida A-4, mijeloperoksidaze, komplementa C4B i C7, inhibitora C1 proteaze, α -2-HS glikoproteina itd. Ekstenzivne promene serumskih koncentracija i aktivnosti različitih metabolita, lipidnih medijatora i proteina utiču na imunske ćelije u smeru smanjenja kapaciteta za povećanu potrošnju kiseonika nakon aktivacije u sledećim inflamacijama. Kada je reč o prolongiranom bavljenju fizičkom aktivnošću, odnosno tzv. hroničnom vežbanju treba navesti da su i tu primećene promene u funkciji imunskog sistema (Nieman et al., 2014). U radu Šanelija i saradnika je pokazano da kod ljudi koji svakodnevno treniraju dolazi do promena u broju neutrofila, kao i u nivoima granulocitnih faktora rasta, CRP-a i signalnih molekula poput IL-10 i TNF α . Stepenn varijacije u nivoima navedenih parametara nije isti i zavisi pre svega od nivoa fizičkog opterećenja. Tako su kod dugotrajnog bavljenja fizičkom aktivnošću snižene vrednosti TNF α , IL-10, granulocitnog faktora rasta i broja neutrofila (Shanely et al., 2013). Curi i saradnici su u svom naučnom istraživanju dokazali da intenzivna fizička aktivnost značajno utiče na metabolizam netrofilnih granulocita, dovodeći do njihove povećane apoptoze usled smanjene koncentracije glikemije u krvi, kao primarnog izvora energije za metabolizam neutrofila (Curi et al., 2020).

Jensen i saradnici su ispitivali razlike u nivoima TNF α i kod vojnika koji su praktikovali visoko intenzivnu fizički aktivnost pešačenja sa teretom kroz period od 40 dana (Jensen et al., 2019). TNF α igra značajnu ulogu u regulisanju aktivacije, hemotakse, fagocitoze i drugih antimikrobnih funkcija neutrofila. Njihovi rezultati su ukazali na to da, što su veće distance koji su vojnici prelazili s teretom, to su nivoi TNF α niži, a samim tim i funkcija neutrofila, što ukazuje na efekte dugotrajne fizičke aktivnosti.

Pored ovih, sve je više dokaza da prolongirani uticaj FA ima kompleksni antiinflamatorni efekat, ne samo na funkciju neutrofila. Dokazano je da redovna i kontinuirana fizička aktivnost ima inflamatorni efekat koji moduliše više mehanizama koji uključuju: regulaciju inflamatornih signalnih puteva, oslobađanje miokina koji stimulišu proizvodnju IL-1 α i IL-10, redukcija metabolički aktivnog visceralnog masnog tkiva, poboljšanje oksigenacije i regulacije nivoa oksilipina (Simpson et al., 2015). Još jedan bitan segment dugotrajnog bavljenja fizičkom aktivnošću je i smanjenje oksidativnog stresa poboljšavanjem antioksidativne zaštite i to, povećanom sintezom i aktivnošću enzima poput katalaze, superoksid dismutaze i glutatation peroksidaze i neenzimskih antioksidanasa uključujući glutatation (Valacchi et al., 2018).

Pojedine studije su pokazale da različit intenzitet FA može dovesti do epigenetskih promena u različitim ćelijskim populacijama, poput mišićnih, masnih i germinativnih ćelija, utičući kako na strukturu hromatina, tako i na DNK i mikro RNK. Ljudski genom se sastoji od približno 3 milijarde baznih parova DNK, koja je upakovana u kompaktnu strukturu zvanu hromatin. Hromatin se sastoji od nukleozoma, koji se sastoje od DNK omotane oko jezgra histonskog proteina. Struktura hromatina igra kritičnu ulogu u regulaciji ekspresije gena jer može da promovise ili inhibira pristup DNK transkripcionim faktorima, RNK polimerazi i drugim regulatornim proteinima. Dinamička priroda strukture hromatina omogućava promene u ekspresiji gena kao odgovor na spoljašnje stimulse kao što je različit intenzitet FA (Neufer et al., 2015).

Rezultati naučnih studija su dokazali da visoko intenzivna FA izaziva promene u strukturi hromatina koje dovode do promena u ekspresiji gena. Na primer, studija koju su sprovedeli Perry i saradnici (Perry et al., 2008) su otkrili da je 12 nedelja treninga aerobnog tipa visokog intenziteta dovelo do promena u strukturi hromatina u promotorskim regionima gena uključenih u mitohondrijalnu biogenezu i oksidativni metabolizam. Ove promene su bile povezane sa povećanom ekspresijom gena i poboljšanom funkcijom mitohondrija u ćelijama skeletnih mišića. Jedan od mehanizama pomoću kojeg FA može da moduliše strukturu hromatina je kroz aktivnost enzima koji modifikuju histon. Enzimi koji modifikuju histon, kao što su histon acetiltransferaze (HAT) i histon deacetilaze (HDAC) mogu dodati ili ukloniti acetil grupe iz proteina histona, koji mogu izmeniti strukturu hromatina i regulisati ekspresiju gena. Pokazalo se da FA povećava aktivnost HAT-a i smanjuje aktivnost HDAC-a, što dovodi do povećanja acetilacije histona i promena u ekspresiji gena (McGee, 2009).

Pored modifikacije histona, FA takođe može uticati na strukturu hromatina kroz promene u metilaciji DNK. Metilacija DNK je proces kojim se metil grupe dodaju molekulu DNK, obično na ostacima citozina u CpG dinukleotidima. Metilacija DNK može da promeni strukturu hromatina regrutovanjem proteina koji se vezuju za metilovanu DNK i inhibiraju pristup DNK transkripcionim faktorima i drugim regulatornim proteinima. Pokazalo se da redovna fizička aktivnost menja obrasce metilacije DNK u genima uključenim u metabolizam i upalu, što može doprineti pozitivnim efektima fizičke aktivnosti na zdravlje (Barres et al., 2012).

Drugi mehanizam pomoću kojeg fizička aktivnost može da moduliše strukturu hromatina je kroz aktivnost mikroRNK (miRNA). miRNA su male nekodirajuće RNK koje se mogu vezati za molekule RNK (mRNA) i regulisati njihovo prevođenje u protein. Pokazalo se da redovna fizička aktivnost menja ekspresiju miRNK uključenih u rast i metabolizam mišića, što može doprineti adaptivnim odgovorima na vežbanje (Liu et al., 2017). Efekti fizičke aktivnosti na strukturu hromatina nisu ograničeni na ćelije skeletnih mišića. Takođe se pokazalo da FA menja strukturu hromatina u drugim tipovima ćelija kao što je masno tkivo. Na primer, studija Stinkens i saradnika je otkrila da akutna, visoko intenzivna FA povećava ekspresiju gena uključenih u metabolizam lipida u masnom tkivu kroz promene u strukturi hromatina (Stinkens et al. 2018). Slično, studija Denhama i saradnika je otkrila da akutna, visoko intenzivna FA menja strukturu spermatozoida i germinativnih ćelija, što dovodi do promena u ekspresiji gena u vezi sa različitim vrstama hroničnih nezaraznih bolesti, karcinoma, autoimunih i autoinflamatornih bolesti (Denham et al., 2015). Ukratko, fizička aktivnost uglavnom visokog intenziteta može da moduliše strukturu hromatina kroz različite mehanizme uključujući modifikaciju histona, metilaciju DNK i aktivnost mikro RNA.

Sve prethodno navedene studije su pokazale da različit intenzitet FA može dovesti do dinamičkih i funkcionalnih promena neutrofilnih granulocita, a takođe i drugih ćelija umunskog sistema. Dodatno, može doći do promene u strukturi hromatina, DNK i mikro RNK, kod mišićnih, masnih i germinativnih ćelija. Međutim, u literaturi ne postoji ni jedna studija koja je dokazala da usled povećanog intenziteta FA dolazi do strukturnih promena neutrofilnih granulocita, tj. da dolazi do promena hromatinske organizacije koja može dovesti do značajne epigenetske modulacije koja se može detektovati GLCM metodom teksturalne analize.

Analizom rezultat naše studije nismo dobili statistički značajnu povezanost između umerenog i visokog intenziteta fizičke aktivnosti i strukturne organizacije neutrofilnih granulocita. Potencijalni razlozi ovakvih rezultata se se mogu objasniti sledećim pretpostavkama.

Procenjeni poluživot neutrofila u ljudskoj krvi je samo 19 sati. Životni vek neutrofila se, međutim, može produžiti do 72 sata kada se aktiviraju. Zbog kratkog životnog veka, neutrofili u krvi moraju se stalno formirati iz ćelija prekursora koštane srži (Curi et al., 2020).

Ovo je jedan od mogućih razloga zašto nije bilo promena u strukturi neutrofilnih granulocita između ispitanika, jer vreme uzimanja krvi za analizu možda nije značajno koreliralo sa uticajem različitog intenziteta FA na moguću strukturnu reorganizaciju neutrofilnih granulocita.

Drugi potencijalni razlog zašto nije bilo značajne povezanosti između različitog intenziteta FA i strukturne organizacije hromatina neutrofilnih granulocita, kao i korelacije intenziteta FA i komponenti mentalnog distresa je način određivanja intenziteta FA. U našoj studiji, za procenu intenziteta FA smo koristili međunarodni upitnik fizičke aktivnosti (IPAQ), koji je jedan od upitnika koji služi za samoprocenu intenziteta FA, i to apsolutnih vrednosti. Mere apsolutnog i relativnog intenziteta mogu da daju veoma različite procene intenziteta fizičke aktivnosti (Strath et al., 2013). Kao primer, hodanje se vrlo često opisuje kao fizička aktivnost umerenog intenziteta; međutim, stvarni intenzitet za pojedinca može varirati.

U apsolutnom smislu, hodanje brzinom od ≈ 4.8 km/h je ekvivalentno 3.3 MET, što ispunjava kriterijume za umereni intenzitet. Međutim, razlika se može primetiti kada se uporede pojedinci različitih nivoa fizičke spremnosti (osoba A sa VO_2max od 17,5 mL $O_2/kg/min$ (ekvivalentno 5 MET), u odnosu na osobu B sa VO_2max od 42 mL $O_2/kg/min$ (ekvivalentno 12 MET) hodajući istom brzinom od ≈ 4.8 km/h. Sa apsolutnog stanovišta, i osoba A i osoba B rade na istom apsolutnom nivou intenziteta fizičke aktivnosti (3.3 MET). Međutim, sa relativnog stanovišta, osoba A radi na nivou napornog intenziteta (hoda sa 60% VO_2max), dok osoba B izvodi aktivnost niskog intenziteta (hoda sa 25% od VO_2max). Prevođenje apsolutnih podataka u relativni intenzitet aktivnosti moguće je samo ako je poznat maksimalna potrošnja kiseonika kod subjekta. Upitnici, nažalost, obično ne pružaju takve informacije (Shephard, 2003; Strath et al., 2013).

Takođe, postoje značajne inter-individualne varijacije u intenzitetu FA i ukupnoj potrošnji energije za različite aktivnosti, u zavisnosti od starosti, pola, telesne mase, veštine i nivoa fizičke kondicije ispitanika (Shephard, 2003). Na primer, tempo hodanja se razlikuje između onih koji se bave svakodnevnim životnim aktivnostima i onih koji ciljano hodaju. Štaviše, energetske potrošnje nekih aktivnosti su ili nedovoljno poznate, ili su se promenile od kada su podaci prvi put prikupljeni. Konačno, neki autori su preveli podatke u MET vrednosti pretpostavljajući standardnu vrednost od 1 kcal/min za bazalni metabolizam; u stvari, vrednosti variraju u zavisnosti od starosti, pola i površine tela od oko 0.8 do 1,4 kcal/min, a samim time i intenzitet aktivnosti značajno varira.

U naučnim radovima je takođe bilo sugestija da ispitanici nemaju jasnu percepciju svoje fizičke spremnosti (Wasfy and Baggish, 2016). Učestalost aktivnosti se obično definiše u minutama provedenim u aktivnosti, kao i danima nedeljno. Ovo može biti razuman pristup kada se vrši opšta procena uobičajene aktivnosti - na primer, broj sesija aktivnosti koje izazivaju znojenje u trajanju od 20 minuta ili duže. Međutim, ako se takva procena više puta primenjuje na širok spektar pojedinačne aktivnosti kao što su hodanje,

trčanje, vožnja bicikla i plivanje, subjekti su skloni da precene ukupan broj sati aktivnosti koje obavljaju u sedmici. Učestalost mnogih aktivnosti značajno varira, čak i u intervalu od nekoliko dana, i nažalost ispitanici su skloni da navedu svoju najvišu skorašnju ili željenu, a ne pravu prosečnu učestalost u fizičkoj aktivnosti. Neke od najvećih precenjivanja trajanja fizičke aktivnosti potiču iz fiskulturne sale ili teretane, gde se veliki deo treninga od 45 ili 60 minuta može potrošiti na slušanje uputstava ili čekanje na red za korišćenje određene opreme (Ainsworth et al., 2015).

Jedan od značajnih i vrlo potentnih mehanizama kojima neutrofili ostvaruju svoju funkciju su neutrofilne ekstracelularne zamke (NEZ). NEZ se oslobađaju iz stimulisanih neutrofila i predstavljaju trodimenzionalne mrežaste strukture izgrađene od citoskeleta nukleusa, DNK molekula, histona i proteina neutrofilnih granula. NEZ funkcionišu kao mreže u kojima bivaju zarobljene oštećene ćelije ili mikroorganizmi omogućavajući lizozomalnim enzimima da razgrade zarobljene materije uz minimizaciju oštećenja okolnih ćelija. Proces oslobađanja NEZ je regulisan od strane nekoliko faktora, i to: nikotinamid adenin dinukleotid fosfata, oksidaze protein-arginin deaminaze 4, RKV itd. (Shi et al., 2019). Nakon inicijacije procesa, dolazi do dekondezacije hromatina koja je katalisana granularnom peroksidazom i neutrofilnom elastazom. Na kraju, NEZ se oslobađa rupturom ćelijske membrane što vodi u ćelijsku smrt, a za njihovo uklanjanje su odgovorni makrofazi (Castanheira et al., 2019). Stoga, stepen kondenzacije hromatina u neutrofilima može biti u korelaciji sa njihovom aktivnošću, a u kontekstu fizičke aktivnosti povezan sa njenim intenzitetom i vremenskim trajanjem. Potencijalno objašnjenje naših rezultata može ležati u tome da u momentu testiranja naši ispitanici nisu bili izloženi visoko intenzivnoj fizičkoj aktivnosti pa se i potencijal neutrofila u formiranju NEZ nije mogao istaći, i na taj način nije došlo do strukturne promene neutrofilnih granulocita koja je bilo moguće detektovati GLCM teksturalnom analizom. Definitivan uticaj fizičke aktivnosti na neutrofile i organizaciju hromatina bi mogao biti ispitan dodatnim analizama npr. određivanjem koncentracije slobodne DNK u serumu ispitanika kao što su to Beiter i saradnici uradili. U ovoj studiji, Beiter i saradnici su 6 vrhunskih sportista, starosti između 20 - 33 godina, izložili napornoj fizičkoj aktivnosti na pokretnoj traci i određivali količinu slobodne DNK i aktivnost DNAze u serumu i na preparatima razmaza periferne krvi analizirali morfologiju granulocita i pratili formiranje NEZ (Beiter et al., 2014). Nakon kliničke studije, autori su primetili da je u serumu došlo do značajnog porasta u količini slobodne DNK i aktivnosti DNAze, ali na preparatima razmaza morfologija neutrofila je delovala neizmenjena, što potencijalno može biti slučaj i sa našom studijom. Detaljnijom analizom autori su uvideli da je ipak došlo do promene u citoarhitektonici jedra u smeru uvećanog jedra i istaknutih DNK fibrila. Navedena studija je pokazala da promene u organizaciji genetičkog materijala prolaze kroz faze pre nego što dođe do pojave morfološki vidljivih promena pod svetlosnim mikroskopom.

Takođe, jedno od objašnjenja zbog kojih nismo dobili statistički značajnu povezanost između umerenog i visokog intenziteta fizičke aktivnosti i strukturne organizacije neutrofilnih granulocita može biti u tkz. „polarizaciji fizičke aktivnosti“. Osoba može ispuniti dnevne preporuke za fizičku aktivnost kratkim vežbama umerenog ili napornog intenziteta, a onda ostati fizički neaktivna ostatak dana, stvarajući tako „polarizaciju“ fizičke aktivnosti: imati visoku ili umerenu dozu planirane fizičke aktivnosti, uprkos tome što sa druge strane postoji niska potrošnja energije u uobičajenim dnevnim aktivnostima zbog velikog obima sedentarnog načina života. Imajući u vidu da se radi o univerzitetkim sportistima, studentima medicine, koji imaju zahtevne ispite i provode dosta vremena sedeći, ovaj entitet se može uzeti u obzir u našem istraživanju. Dokazano je da polarizacija fizičke aktivnosti može dovesti čak i do povećanog rizika od negativnih uticaja po zdravlje uprkos ispunjavanju preporuka za fizičku aktivnost (Malm et al., 2019). Zbog svega prethodno navedenog, ostaje zaključak da je ovo po našim saznanjima prva studija koja je pokušala da analizira pitanje u kom stepenu različiti intenziteti fizičke aktivnosti moduliraju strukturu neutrofilnih granulocita, kao i to da je ova tema još uvek složena i nedovoljno istražena, i da je u budućnosti potrebno analizirati koje su najbolje tehnike i metode naučno istraživačkog rada kojima bi ova povezanost postala jasnija i preciznije definisana.

U našoj studiji, je po prvi put, pokazano da su neki od GLMC parametara strukture hromatina u neutrofilima povezani sa nivoima mentalnog distresa kod zdravih mladih sportista, u fiziološkim uslovima. Prema našim rezultatima, homogenost i uniformnost teksture hromatina su bili u statistički visoko značajnoj negativnoj korelaciji sa mentalnim distresom, dok je statistički visoko signifikantna pozitivna korelacija detektovana između teksturalnog kontrasta jedarne strukture ćelija i nivoa mentalnog distresa merenog DASS-21 skalom, kao i nivoa anksioznosti merene GAD-7 skalom. Ovi parametri pokazuju relativno dobru diskriminatornu sposobnost u razlikovanju učesnika sa normalnim i povišenim nivoom mentalnog distresa. U radu smo konstruisali model mašinskog učenja koji na osnovu binomne logističke regresije koristi navedene, i druge teksturne karakteristike, za predviđanje povećanog nivoa mentalnog distresa na osnovu rezultata dobijenih analizom razmaza periferne krvi ispitanika.

Rezultati naše studije su u potpunosti u saglasnosti sa rezultatima naučne studije Pantića i saradnika iz 2019. godine. U ovoj studiji su autori dokazali statistički značajnu negativnu korelaciju teksturalne homogenosti hromatina neutrofilnih granulocita sa nivoima mentalnog distresa kod pacijenata sa rekurentnim depresivnim sindromom (Pantic et al., 2019). Rezultati ove naučne studije su pokazali da je postojala statistički visoko značajna ($p < 0,01$) korelacija između IDM hromatina neutrofilnih granulocita i skora na skali stresa u okviru DASS-21. Korelacija je bila negativna, što znači da je povećanjem IDM nivo stresa opadao, i obrnuto.

Ovo je bila prva i jedina naučna studija koja je analizirala povezanost strukturnih promena hromatina neutrofilnih granulocita i nivoa mentalnog distresa. Zbog nedostatka naučnih studija koje su istraživale istu ili sličnu temu kao naše istraživanje, objašnjenje naših rezultata kao i opravdanost istraživanja možemo diskutovati u sledećim naučnim studijama koje su koristile istu tehniku teksturalne analize kako za strukturu hromatina, tako i drugih specifičnih morfoloških karakteristika ćelije, samo na drugim ćelijama, a takođe je značajno pomenuti studije koje su se pre svega bavile funkcionalnim promenama neutrofilnih granulocita. Pantić i saradnici su 2013. godine predstavili rezultate koji su ukazivali na to da su entropija, ugaoni drugi moment, varijansa i korelacija teksture nuklearne strukture limfocita određene GLCM metodom različite u korteksu timusa u poređenju sa medulom. Ovi rezultati su sugerisali da GLCM kao metoda može imati određeni potencijal u otkrivanju diskretnih promena u nuklearnoj strukturi (Pantic et al., 2013). U naučnom radu Parka i saradnika pomoću GLCM teksturalne analize je istraživana strukturna složenost i tekstura citoskeleta i jedra u ljudskim mezenhimskim matičnim ćelijama tokom rane faze diferencijacije u osteoblaste metodom diferencijacije-indukcije: mehaničkim i/ili hemijskim stimulusima. Park i saradnici su dokazali da su u jedrima ćelija koje su bile stimulisane sa oba stimulusa izračunate veće vrednosti za varijansu i homogenost, što ukazuje da je raspored hromatina bio neskladan u ranoj fazi diferencijacije. Pokazano je i potvrđeno da kombinovana stimulacija mehaničkim i hemijskim faktorima ubrzava diferencijaciju matičnih ćelija, čak i u ranoj fazi (Park et al., 2014). U svojoj studiji Martinović i saradnici su analizirali strukturnu organizaciju hromatina limfocita kod tri grupe ispitanika: prve grupe ispitanika koji su imali dijabetes tip 2, druge grupe ispitanika koji su imali dijabetes tip 2 i koji su lečeni metforminom, i treće grupe zdravih ispitanika, korišćenjem konvencionalnih kompjuterski potpomognutih metoda, fraktalne analize i analize matrice ko-pojavljivanja sivih vrednosti (GLCM). GLCM analiza angularnog drugog momenta (ASM) otkrila je razlike u hromatinskoj strukturi limfocita kod ispitanika koji su imali dijabetes tip 2 i koji su lečeni metforminom, i druge dve grupe ispitanika (Martinović et al., 2018). Dinčić i saradnici su u svom istraživanju razlika između nuklearnih karakteristika papilarnog karcinoma štitne žlezde i Hašimotovog tireoiditisa dokazali da postoji statistički značajna razlika između kontrasta, korelacije, ugaonog drugog momenta i homogenosti GLCM-a parametara u teksturi hromatina folikularnih ćelija kod Hašimotovog tireoiditisa i maligno izmenjenjenih ćelija (Dincic et al., 2020). Paunović i saradnici su u svom naučnom radu koristili GLCM algoritam kao metodu za detekciju diskretnih promena u distribuciji hromatina hepatocita nakon in vivo izlaganja nanočesticama gvožđe oksida. Istraživači su u ovom naučnom radu primetili da postoji statistički značajna povezanost između hepatocita koji su izloženi dejstvu nanočestica gvožđe oksida i smanjenje uniformnosti teksture hromatina merene kao GLCM angularni drugi moment, a takođe slične promene su detektovane za homogenost teksture hromatina izražene kao vrednost inverznog momenta razlike (Paunović et al., 2020). U naučnoj studiji Yamamota i saradnika pomoću GLCM testuralne analize morfoloških karakteristika je izvršena diferencijacija 5 tipova leukocita (neutrofili,

limfociti, eozinofili, bazofili i monociti), a rezultati su pokazali da je osetljivost analize iznosila 95.6%, a specifičnost 99.3% (Yamamoto et al., 2017). Kono i saradnici su u svojoj studiji na osnovu razlike u morfološkim specifičnostima upotrebili GLCM testuralnu analizu za kvantitativno razlikovanje četiri tipa ćelija prekursora eritrocita: proeritroblasta, bazofilnih eritroblasta, polihromatskih eritroblasta i ortohromatskih eritroblasta. Prosečna stopa podudarnosti (osetljivost) metode iznosila je 95,8% (87,5-100,0), a prosečna specifičnost 97,6% (Kono et al., 2018).

Prema rezultatima Demira i saradnika, stres i depresija u nekim slučajevima mogu biti povezani sa povećanim brojem neutrofila (Demir et al., 2015). U ovoj naučnoj studiji je pokazano da pojedinci sa major depresivnim poremećajem, koji nisu podvrgnuti farmakološkoj terapiji, mogu imati značajno povećan odnos neutrofila i limfocita, verovatno usled promena nivoa određenih proinflamatornih citokina. Tsai je u svom revijskom radu ukazao na značaj IL-8, proinflamatornog citokina kojeg, između ostalog, proizvode i ćelije mikroglije i to u većoj meri u okviru brojnih psihičkih poremećaja poput: depresije major, bipolarnog poremećaja, anksioznih stanja, shizofrenije i demencije (Tsai, 2021). Navedeni citokin stimuliše adhezivnost, hemotaksičnost i povećanu lizozimsku aktivnost neutrofila. Povećana migracija neutrofila je prema Jakobsonu i saradnicima značajan faktor u reorganizaciji hromatina (Jacobson et al., 2018). Naime, oni su primetili da u ćelijskoj kulturi neutrofila dolazi do reorganizacije genoma i to prvenstveno heterohromatina, prilikom migracije ćelija kroz uzane pore. Zaključili su da je heterohromatin mehanoreaktivni oblik hromatina koji štiti transkripciono aktivne kontakte od remetilačkih efekata migracije. U radu Hanfera i saradnika u populaciji od 40 studenata je dokazano da se baktericidna sposobnost neutrofila značajno smanjuje usled izlaganja 10-minutnom mentalnom stresu (Khanfer et al., 2010). Oni su ispitanike izlagali 10-to minutnom stresnom zadatku i potom iz uzorka periferne krvi analizirali protočnom citometrijom funkciju neutrofila. Njihovi rezultati su pokazali da mentalni stres može smanjiti proizvodnju ćelijskog superoksidnog anjona, a time i fagocitnu sposobnost neutrofila (Khanfer et al., 2010).

U animalnim modelima depresije su otkrivena inflamatorna žarišta kako u mozgu tako i u perifernim tkivima a značaj ovog otkrića se ogleda u stepenu rezistentnosti pacijenata koji boluju od depresije na trenutno dostupnu farmakološku terapiju (Kitaoka, 2022). Kao značajan uzrok neuroinflamacije se navodi akutni i hronični stres. Zanimljiva zapažanja ove studije su da se bez obzira na trajanje stresa, broj neutrofila povećava, a takav efekat nastaje kao direktna posledica stimulacije progenitorskih ćelija neutrofilne loze, dok se za ostale loze u zavisnosti od trajanja stresnog stimulusa razvija manji ili veći stepen supresije.

Kada govorimo o mentalnom stresu, pokazano je da može imati supresivne efekte na neke od funkcija neutrofila kao što su fagocitoza i baktericidna aktivnost. U eksperimentalnim modelima, baktericidna aktivnost ovih ćelija može biti značajno smanjena nakon izlaganja čak i kratkotrajnim stresnim stimulansima.

Kinoshita i saradnici su u svom radu izlagali miševu stresu, uranjanjem u vodu na 1 ili 2 h na 37°C (Kinoshita et al., 2019). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da usled mentalnog stresa kod životinja dolazi do smanjene fagocitne sposobnosti i efektivnosti neutrofila izolovanih iz periferne krvi u smanjivanju patogenosti *E. coli*. Autori su takođe primetili da su ispitivani granulociti ispoljili promene koje su identične početnoj fazi procesa programirane ćelijske smrti.

Pored konkretne povezanosti stresa i funkcije neutrofila, od posebnog interesa je odnos između mentalnog stresa i signalnih molekula u inflamaciji. Prolongirani stres može biti povezan sa regulacijom nivoa određenih proinflamatornih citokina, i pretpostavlja se da je to jedan od mehanizama koji doprinosi nastanku različitih bolesti povezanih sa stresom. Akutni stres, ali takođe i oporavak od stresa, mogu uticati na povećanu ili smanjenu proizvodnju određenih citokina (Faith et al., 2019). Prema rezultatima Kempa i autora, nakon izlaganja miševa akutnom stresu, ćelije mikroglije su sekretovala veće koncentracije faktora nekroze tumora α (TNF α) koji je bitan regulator sinapsne aktivnosti u ventralnom hipotalamusu, gde se nalazi integrativni centar za reagovanje na stresne stimuluse. TNF α takođe ima ulogu u ćelijskoj signalizaciji i regulaciji funkcija ćelija imunskog sistema kroz nekoliko poznatih mehanizama (povećana hemotaksa, adhezivnost, fagocitna sposobnost, ameboidno kretanje) (Kemp et al., 2022). Pored TNF α , u literaturi se navodi da tokom i nakon kontakta sa stresnim stimulusom rastu i koncentracije interleukina 6 (IL-6), koji ima potencijalno značajne efekte na proizvodnju i funkciju ćelija nespecifične imunosti (Niraula et al., 2019).

Mehanizmi regulacije ekspresije gena za TNF α i IL-6 u okviru inflamacije indukovane stresom su kompleksni, i pored direktnih efekata na transkripciju i translaciju navode se i epigenetički aspekti regulacije u smeru metilacije/acetilacije histona, što posledično može dovesti i do značajne redistribucije hromatina. Pored efekata signalnih molekula u inflamaciji, još jedan od mogućih molekularnih mehanizama kojim mentalni stres izaziva morfološke promene u neutrofilima uključuju i stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta (RKV). Reaktivne kiseonične vrste se definišu kao atomi kiseonika koji imaju jedan nespareni elektron i koji u cilju postizanja elektrohemijske stabilnosti, taj elektron preuzimaju od susednih jedinjenja pokrećući na taj način oksidativnu kaskadu oštećenja. U okviru RKV navode se jedinjenja poput: vodonik peroksida, superoksidnog anjona i hidroksilnog radikala. Oksidativno oštećenje je jedan od mehanizama kojim se služe ćelije imunskog sistema u borbi protiv različitih patogena. Primera radi, kada se neutrofili susretnu sa nekim mikroorganizmom, dolazi do fagocitoze i nastajanja ranog fagozoma. Intracelularnim transportom, fagozom se spaja sa lizozomima i unutar novonastalog fagolizozoma dolazi do procesa koji se naziva „oksidativni prasak“. Naime, u lizozomima se uz pomoć enzima kao što je NADPH oksidaza, proizvodi superoksidni anjon.

Međutim, treba navesti da kao rezultat različitih ćelijskih procesa poput gore navedene fagocitoze, zatim aktivnošću respiratornog lanca u mitohondrijama može doći do tzv. „curenja“ RKV, koji deluju toksično na

komponente ćelije. DNK je posebno osetljiva na dejstvo RKV pa nastala oksidativna oštećenja mogu uticati na organizaciju hromatina (El-Benna et al., 2016; Hu et al., 2020; Salinas et al., 2020). Otkriveno je da u okviru različitih inflamatornih procesa dolazi do povećanog generisanja RKV i posledično, oštećenja gena. Stoga, možemo zaključiti da su korelacijama dobijenim u ovoj studiji doprinele fiziološke promene oksidativnog statusa tokom mentalnog distresa.

Navedeni zaključak je i u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima o promenama izazvanim oksidopaminom u strukturi hromatina limfocita (Pantić et al., 2016). U ovom naučnom radu su istraživači dokazali da proapoptotički hemijski agens, oksidopamin, izaziva promene zavisne od doze u teksturalnim obrascima hromatina koje se mogu kvantifikovati korišćenjem metode matrice ko-pojavljivanja sivih vrednosti (GLCM), i na taj način ukazali da bi se matematički GLCM algoritam mogao uspešno koristiti u detekciji i evaluaciji diskretnih ranih apoptotičkih strukturnih promena hromatina limfocita periferne krvi koje se ne mogu detektovati korišćenjem konvencionalnih tehnika mikroskopije/ćelijske biologije.

Hemijski derivat dopamina, 6-hidroksidopamin je proapoptotski agens koji u dozno-zavisnom režimu smanjuje GLCM parametre teksturalne analize hromatina kao što su ASM i IDM, dok istovremeno povećava vrednosti korelacije i varijanse GLCM parametara. 6-hidroksidopamin je od ranije poznat po svojoj sposobnosti da stimuliše proizvodnju vodonik peroksida, superoksid anjona i hidroksi radikala u raznim populacijama ćelija, ali i po sposobnosti indukovanja programirane ćelijske smrti usled oštećenja DNK (Pantić et al., 2021). Rezultati drugih eksperimenata su takođe sugerisali da toksini i procesi koji doprinose generisanju RKV mogu da povećaju homogenost hromatina i smanje vrednosti ASM i IDM (Nikolovski et al., 2019; Paunović et al., 2020).

Fizički i mentalni stres su snažno povezani sa povećanim generisanjem RKV u neutrofilnim granulocitima (Curi et al., 2020). Promene u transkripciji i potencijalno oštećenje DNK izazvano RKV dovode i do morfoloških promena u hromatinu, samim tim uloga RKV mora biti detaljno analizirana. U eksperimentalnim modelima opekotine kod miševa, otkriveno da dolazi do povećanog stvaranja RKV od strane aktiviranih neutrofila. Oksidativno oštećenje se može uspešno inhibirati primenom antioksidativnog enzima - superoksid dismutaze, 1 - 2 h nakon stresnog događaja (Miyazaki et al., 2015). Pored traume, i akutna infekcija takođe može biti posmatrana kao značajan stresogeni faktor. Vinit i saradnici su ispitivali generisanje RKV u neutrofilima kod: pacijenata sa teškom formom COVID-19, sepsom i kod zdravih pojedinaca (Veenith et al., 2022). Visoki nivoi RKV su korelisali sa većim brojem neutrofila koji su zapaženi u grupama pacijenata sa težom formom COVID-19 i sepsom i to čak u devet puta većoj koncentraciji nego kod zdravih pojedinaca. Uloge RKV u ovim uslovima su nejasne i oprečne. Neki autori smatraju da imaju ulogu da olakšaju fagocitozu tkivnog detritusa, drugi da dovode do inhibicije ovog procesa, a prema nekima RKV služe kao signalni molekuli i privlače ćelije imunskog sistema na mesto oštećenja tkiva.

U radu Nunes-Silve i saradnika miševi su bili izlagani kratkotrajnoj intenzivnoj fizičkoj aktivnosti na pokretnoj traci, u periodu od oko sat vremena (Nunes-Silva et al., 2014). Nakon 12 i 24 časova od izlaganja u tkivu *m.kvadriicepsa* je primećena povećana migratorna sposobnost i posledično povećan broj neurofila i monocita. U istom eksperimentu na liniji miševa kojima je suprimiran gen za NADPH oksidazu, primećeno je da postoji smanjena migratorna aktivnost što ukazuje na to da RKV imaju bitnu ulogu u hemotaksi ćelija urođenog imuniteta.

Uticaoje mentalnog distresa na generisanje RKV i posledično ćelijski odgovor na distres stoji u osnovi mehanizama razvoja različitih psihosomatskih poremećaja (Hayashi, 2015). Kim i saradnici su pokazali da nakon izazivanja stresa kod zdravih ispitanika i ispitanika obolelih od shizofrenije, dolazi do značajnog povećanja nivoa RKV u plazmi obolelih od shizofrenije u odnosu na zdrave pojedince. Različiti mentalni poremećaji u osnovi imaju narušenu redoks ravnotežu (Kim et al., 2021). Prema rezultatima nekih drugih studija, dokazano je da hormoni stresa iz hipotalamus-hipofizanaadbubrežna žlezda osovine mogu uticati na transkripciju gena čiji su krajnji efekti uključeni u stvaranje RKV. Mehanizmi kojima se postižu navedeni efekti mogu biti direktni i to aktivacijom različitih intracelularnih signalnih puteva ili indirektni, preko povećane sinteze i oslobađanja proinflamatornih citokina. U zavisnosti od stepena oštećenja, odnosno nivoa RKV i antioksidativne zaštite, promene mogu biti vrlo suptilne i nedetktabilne konvencionalnim metodama mikroskopije ili obimne uz jasno ograničene patomorfološke supstrate. Ukoliko je u pitanju suptilna promena, upotreba kompjuterskog algoritma kao što je GLCM, može olakšati detekciju.

U našoj studiji smo dobili značajne pozitivne korelacije između DASS-21 skora i GLCM kontrasta hromatina. Potencijalno objašnjenje dobijenih rezultata bi moglo ležati u vezi između efekata psihičkog stresa na ekspresiju šaperona. Šaperoni su kompleksi proteina koji imaju ulogu u regulisanju uvijanja proteinskih molekula, odnosno postizanju adekvatne prostorne konformacije proteina (Roufayel and Kadri, 2019; Fatima et al., 2021). Jedan od aspekata funkcije šaperona se ogleda i u uvijanju histonskih proteina i formiranju nukleozoma, a samim time i celokupne organizacije hromatina. Pored ove uloge, šaperoni takođe kontrolišu procese kao što su: uklanjanje pogrešno uvijenih proteina, promena konformacije peptidnih toksina i prevencija agregacije polipeptida. U prošlosti, nekoliko autora je sugerisalo da mentalni stres može povećati ekspresiju šaperona, i da ova disregulacija može biti povezana sa određenim mentalnim poremećajima (Hayashi, 2015). Hayashi i saradnici su u svom radu dokazali da hronični mentalni stres pokreću „reakciju“ na ćelijski stres usled povećane ekspresije šaperona, i na taj način može doći do poremećene citoarhitekture ćelije (DNK, histona, hromatina).

Čini se da postoje sinergistički efekti starenja i stresa na funkciju neutrofila što je prikazano u ranijim radovima (Lord et al., 2019). Starenje je često povezano sa povećanjem cirkulišućih proinflamatornih citokina i promenama u HHN osi. U nekim slučajevima, starenje je takođe povezano sa

specifičnim promenama parametara GLCM hromatina u nekim populacijama ćelija. Na primer, pretpostavlja se da u nekim ćelijama slezine, starenje može povećati entropiju nuklearnog hromatina i smanjenje IDM (Pantić et al., 2012). U radu Bartleta i saradnika ispitivana je aktivnost neutrofila kroz parametre migracije, fagocitoze, oksidativnog praska, ekspresije površinskih receptora, metabolizma i sistemske inflamacije u grupama starijih pojedinaca koji su se imali veći ili manji stepen fizičke aktivnosti i mlađih ispitanika (Bartlett et al., 2016). Njihovi rezultati su pokazali da je migratorna aktivnost neutrofila bila veća u grupi aktivnijih starijih ispitanika i vrlo slična kao u grupi mlađih ispitanika, dok se ostali parametri nisu razlikovali kod starijih ispitanika bez obzira na stepen fizičke aktivnosti. Oni su takođe dobili i značajno povećanje u nivoima proinflamatornih citokina u obe grupe starijih ispitanika u odnosu na grupu mlađih ispitanika, što ukazuje da iako postoji niskostepena inflamacija koja je povezana sa godinama starosti, bavljenje fizičkom aktivnošću utiče na funkciju neutrofila i potencijalno interferira sa faktorima koji dovode do imunosupresije i odumiranja ćelija.

Potencijalni uticaj hormona, kortizola i epinefrina treba uzeti u obzir kao još jedan od faktora koji mogu uticati na reorganizaciju hromatina u neutrofilima (Parks and Davis, 2012). Kortizol može biti odgovoran za razne epigenetičke promene u mnogim populacijama ćelija. Na primer, promene na nivou genoma u nivoima metilacije DNK mogu biti povezane sa izmenjenom reaktivnošću kortizola na stres, kao što je sugerisano u naučnim istraživanjima (Houtepen et al., 2016). Takođe, naznačeno je da određeni faktori koji utiču na aktivnost simpatično-adrenalne osovine mogu izazvati velike epigenetske modifikacije (Jiang et al., 2019). Što se tiče neutrofilnih granulocita, efekti kortizola ili epinefrina na ekspresiju gena i remodeliranje hromatina još uvek nisu u potpunosti shvaćeni, tako da ne možemo doneti definitivne zaključke o tome da li su ova dva hormona imala bilo kakvog uticaja na korelacije otkrivene u našoj studiji.

Verovatno najveća vrednost našeg istraživanja se ogleda u mogućnosti korišćenja računarskih indikatora teksturalne analize u cilju stvaranja modela mašinskog učenja koji bi u teoriji mogli da se koriste za predikciju mentalnog distresa. U ovom trenutku ne postoji biohemijski ili imunološki test iz krvi koji se rutinski koristi za dijagnostiku anksioznih poremećaja ili poremećaja raspoloženja poput depresije. Umesto toga, dijagnozu obično postavlja psihijatar nakon pregleda i uzimanja detaljne istorije bolesti, a na osnovu svoje subjektivne procene i iskustva. U ovom trenutku, postojeće međunarodne klasifikacije bolesti navode dijagnostičke kriterijume za većinu ovih poremećaja i tačno je da se psihijatar usmerava prema ovim kriterijumima tokom postavljanja dijagnoze, međutim, ovakav način psihijatrijske evaluacije je i dalje subjektivan i ponekad dovodi do grešaka. Čak i u najsavremenijim i najefikasnijim zdravstvenim sistemima, često dolazi do nedovoljne usaglašenosti između dva psihijatra u vezi sa postavljanjem dijagnoze za brojne kliničke slike, pri čemu je taj stepen saglasnosti često manji od 80%. (Picardi et al., 2017). Upitnici poput GAD-7, DASS-21 i druge skale se takođe ne koriste rutinski već tokom naučnoistraživačkog rada.

Stoga u psihijatriji već godinama, ako ne i decenijama postoji potreba za razvojem novih, inovativnih dijagnostičkih testova i biomarkera koji bi bili u mogućnosti da barem donekle poboljšaju dijagnostičku preciznost u utvrđivanju komponenti mentalnog distresa.

Tokom poslednjih deset godina, svedoci smo ubrzanog razvoja mašinskog učenja i veštačke inteligencije sa potencijalnom primenom u svim medicinskim oblastima, a psihijatrija i neuronauke nisu izuzetak. Generalno, postoje dva tipa mašinskog učenja: učenje pod supervizijom i učenje bez supervizije. Kod mašinskog učenja pod supervizijom, kompjuterskom modelu (mašini) se prezentuje serija primera u kojima su ulaznim podacima asocirani izlazni podaci. Vremenom, mašina „nauči“ da pravilno asocira ulaz sa izlazom, odnosno uoči diskretne i kompleksne obrasce u organizaciji podataka. Nakon toga, model stiče sposobnost da sam predvidi izlazni podatak na osnovu datog ulaznog podatka. Kad je u pitanju budući dijagnostički test u oblasti psihijatrije, ulazni podaci bi bili neki krvni biohemijski ili imunološki parametri (u našem slučaju GLCM indikatori jedra neutrofilnih granulocita), a izlazni podatak bi bila dijagnoza mentalnog poremećaja ili ocena nekog psihičkog simptoma (u našem slučaju, to bi bio skor za parametre mentalnog distresa). Za razliku od mašinskog učenja pod supervizijom, mašinsko učenje bez supervizije podrazumeva davanje slobode mašini da sama detektuje specifične obrasce organizacije i distribucije podataka bez unapred zadatog početka i cilja. Ovakve metode su često sporije, kompleksnije i teže za implementaciju, pa se u medicinskim naukama ređe primenjuju.

U neuronaukama, od metoda mašinskog učenja pod supervizijom, verovatno najveći potencijal imaju algoritmi drva odluke (engl. „decision trees“), mašine sa potpornim vektorima (engl. „Support Vector Machine“, SVM) kao i metode zasnovane na dubokom učenju.

Prvi model mašinskog učenja su predstavljala drva odluke, koja su u osnovi grupa pravila koje mašina prati imajući u vidu ulazne parametre koji su obično na racionalnoj skali. Koristeći različita pravila, kao i različite obrasce „granjanja“ gradi se algoritam gde svaka grana u stvari predstavlja odluku u kom smeru će ići dalji proces zaključivanja. Kada postoji veliki broj drva odluke onda se često koristi algoritam slučajnih šuma (engl. „Random Forests“), a finalna odluka se donosi na osnovu većinske ocene drva odluka koja su učestvovala u odlučivanju. U našoj studiji, ovaj model se pokazao kao metod sa najboljim performansama u smislu prediktorne sposobnosti za nivo anksioznosti merene GAD-7 skorom. Ovo ujedno predstavlja prvo istraživanje u kome je model slučajnih šuma korišćen za predikciju nekog psihološkog parametra uz upotrebu GLCM indikatora kao ulaznih podataka za treniranje.

Drugi model mašinskog učenja pod supervizijom koji je predložen u našoj studiji u cilju predikcije psiholoških parametara je model mašine sa potpornim vektorima (engl. „Support Vector Machine“). Princip rada ovog modela se zasniva na pronalaženju hiperravni koja najbolje razdvaja odnosno

klasifikuje podatke, odnosno ravni koja se odlikuje najvećom udaljenošću od najbližih vrednosti posmatranih varijabli. U prošlosti je u biologiji i medicini korišćen u mnogim studijama u cilju klasifikacije medicinskih podataka, ali ovo je prvi put da je upotrebljen u cilju regresije, odnosno za predviđanje varijable na racionalnoj skali imajući u vidu GLCM ulazne podatke. Nažalost, prediktorna sposobnost u našoj studiji je bila relativno mala u poređenju sa modelom slučajnih šuma što ukazuje na manju verovatnoću potencijalno uspešne primene u budućnosti na većim i heterogenijim uzorcima.

Potrebno je istaći da pristupi zasnovani na modelima mašinskog učenja i veštačkoj inteligenciji, onako kako su primenjeni u našem istraživanju imaju nekoliko bitnih ograničenja. Prvo, uzorak na kome je studija rađena je suviše mali da bi se u potpunosti razvio funkcionalni i validni model, te stoga možemo govoriti isključivo o predlogu hipotetičkih modela koji bi u budućnosti na većem uzorku mogli biti dodatno trenirani i testirani. Na primer, sasvim je moguće da bi na većem uzorku model zasnovan na mašini sa potpornim vektorima imao značajno bolje performanse u smislu prediktorne sposobnosti. Takođe, ovaj model, kao i model zasnovan na slučajnim šumama imaju brojne hiperparametre, od kojih su samo neki u našem istraživanju testirani. Optimizacija hiperparametara na velikom uzorku kod ovih modela često zahteva značajnu procesorsku snagu i druge faktore i u budućnosti će biti neophodno da se svi aspekti funkcionisanja ovih modela detaljno ispituju. Takođe, potrebno je napomenuti da je put od treniranja do pune implementacije modela mašinskog učenja u medicine često kompleksan i udružen sa brojnim izazovima i preprekama. Kad su u pitanju humani ispitanici (za razliku od ćelija u kulturi ili laboratorijskih životinja), uspešno treniranje i testiranje modela čak i na veoma velikom uzorku, ne znači nužno da će model biti primenljiv na drugim delovima populacije i u drugačijim eksperimentalnim ili kliničkim uslovima. Ovo je uglavnom posledica često velike heterogenosti same populacije i sledstvene nemogućnosti da se obezbedi dovoljno veliki uzorak koji bi bio reprezentabilan.

Još jedno bitno ograničenje našeg istraživanja se odnosi ne opšte nedostatke modela mašinskog učenja u pogledu njihove interpretabilnosti. Modeli zasnovani na slučajnim šumama, kao i oni zasnovani na mašinama sa potpornim vektorima se mogu posmatrati kao takozvani modeli „crne kutije“ (engl. „black box models“). Ovo u osnovi znači da je model istreniran da sa određenom preciznošću na osnovu ulaznih podataka (npr. biohemijski ili imunološki parametri) predvidi neki psihološki parametar (npr. nivo anksioznosti ili mentalnog distresa), ali tačan mehanizam na osnovu kojeg se ovo predviđanje vrši ostaje nepoznat. Čak ni vrhunski ekspert za mašinsko učenje ili veštačku inteligenciju nije u mogućnosti da spozna unutrašnje funkcionisanje (engl. „inner workings“) modela, ne zbog nedostatka iskustva i ekspertize već zbog same prirode modela koju odlikuje izrazito visok nivo kompleksnosti. Ova činjenica značajno smanjuje nivo reproducibilnosti istraživanja i može dovesti do toga da dva ista modela, istrenirana na sličnim uzorcima i sličnim eksperimentalnim ili kliničkim uslovima pokažu drastično različite performanse u pogledu klasifikacione preciznosti (npr. kad je u

pitanju dihotomna varijabla) ili predviđačke sposobnosti (kad je u pitanju varijabla na racionalnoj skali).

Jedna od mogućih alternativa modelima mašinskog učenja primenjenim u našem istraživanju predstavlja algoritam zasnovan na neuralnim mrežama. Neuralne mreže su poslednjih godina postale veoma popularni pristup u biomedicinskom modelovanju naročito u analizi dvodimenzionalnih signala poput digitalnih mikrografa i radioloških slika. Kod neuralnih mreža, arhitektura modela se zasniva na jednom ili više slojeva povezanih neurona koji propuštaju informaciju (u jednom ili oba smera), a verovatnoća prolaska informacije kroz određenu sinapsu je determinisana takozvanim težinskim vrednostima koje se formiraju prilikom treniranja. Neuralne mreže takođe, slično slučajnim šumama i mašinama sa potpornim vektorima predstavljaju vid mašinskog učenja pod supervizijom. Drugim rečima, i ovde se modelu tokom treniranja prezentuje serija primera sa korektno asociranim ulaznim i izlaznim podacima, nakon čega model uči da pravilno vrši asocijacije kroz davanje prednosti određenim sinapsama u odnosu na druge sinapse. U medicinskim istraživanjima se danas najčešće koriste multislajсни perceptroni i konvolucione neuronske mreže kao oblici takozvanog „dubokog učenja“. Konvolucione neuralne mreže su posebno pogodne za klasifikaciju medicinskih slika tokom računarske interpretacije preparata u patologiji, kao i snimaka u radiologiji. U našem istraživanju, ovakav vid mašinskog učenja bi u budućnosti dodatno mogao da doprinese prepoznavanju specifične strukture imunskih ćelija asocirane sa povećanim nivoima anksioznosti i mentalnog distresa. Ipak, potrebno je napomenuti da sama činjenica da je neki metod mašinskog učenja danas popularan (neuralne mreže) u smislu primene u razvoju veštačke inteligencije, ne mora nužno da znači da se taj model odlikuje i najvećom klasifikacionom i predviđačkom sposobnošću kada su u pitanju psihološki parametri.

U budućnosti će biti neophodno sprovesti dodatna istraživanja u cilju utvrđivanja naučne vrednosti GLCM metode u neuronaukama, imajući u vidu da je ova računarska tehnika relativno nova u ovoj oblasti. Takođe će na različitim uzorcima i pod uticajem određenih kliničkih faktora biti potrebno razviti veći broj modela mašinskog učenja i deteljno ispitati njihovu validnost, senzitivnost i pouzdanost u predviđanju komponenti mentalnog distresa. Moguće je da, ukoliko istraživači uspeju da razviju efikasan model zasnovan na slučajnim šumama, mašinama sa potpornim vektorima ili neuronskim mrežama, on postane sastavni deo nekog budućeg biomarkera za detekciju komponentni mentalnog distresa, ne samo kod pacijenata sa dijagnostikovanim mentalnim poremećajem već i kod mentalno zdravih osoba. Ovakav sistem bi imao široku primenu u psihologiji i psihijatriji i značajno bi mogao da doprinese unapređenju rane dijagnostike mentalnih poremećaja. Iako smo u ovom momentu još uvek daleko od trenutka kada bi ovakav biosenzor mogao biti primenjen u kliničkoj praksi, naši rezultati predstavljaju potencijalno korisnu osnovu za dalja istraživanja u ovoj multidisciplinarnoj tematici koja obuhvata znanja iz oblasti psihijatrije, psihologije, ćelijske biologije i informacionih tehnologija.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata dobijenih ovom studijom, kao i pretpostavljenih ciljeva, možemo izvesti sledeće zaključke:

1. Analizom međusobne povezanosti teksturalnih parametara strukture i distribucije hromatina neutrofilnih granulocita periferne krvi i nivoa mentalnog distresa kod sportista utvrđeno je sledeće:

- a) Detektovana je statistički visoko značajna negativna korelacija između vrednosti inverznog momenta razlike (IDM) i i angularnog drugog momenta (ASM) jedarne strukture neutrofilnih granulocita i DASS-21 skora.
- b) GLCM teksturalni kontrast je bio u statistički visoko značajnoj pozitivnoj korelaciji sa DASS-21 skorom.
- c) Nivo anksioznosti izmeren GAD-7 skorom je bio u statistički visoko značajnoj negativnoj korelaciji sa angularnim drugim momentom (ASM) i inverznim momentom razlike (IDM).
- d) Utvrđena je pozitivna statistički visoko značajna korelacija GLCM teksturalnog kontrasta jedarne strukture neutrofilnih granulocita i nivoa anksioznosti merene GAD-7 skalom.
- e) DASS-21 skor, kao ni GAD-7 skor nisu bili u statistički značajnoj povezanosti sa vrednostima parametara teksturalne varijanse i korelacije jedra kao parametara GLCM analize.
- f) Nivoi kognitivne preformulacije i emocionalne supresije nisu bili u statistički značajnoj korelaciji ni sa jednim GLCM indikatorom jedarne strukture neutrofilnih granulocita.

2. Analizom međusobne povezanosti intenziteta fizičke aktivnosti i teksturalnih parametara strukture i distribucije hromatina neutrofilnih granulocita periferne krvi utvrđeno je sledeće:

- a) Umeren intenzitet fizičke aktivnosti statistički značajno ne menja strukturnu organizaciju hromatina neutrofilnih granulocita periferne krvi kod sportista.
- b) Visoko intenzivna fizička aktivnost nije u statistički značajnoj korelaciji ni sa jednim parametrom GLCM testuralne analize hromatina neutrofilnih granulocita kod sportista.

3. Analizom međusobne povezanosti nivoa mentalnog distresa i različitog intenzitet fizičke aktivnosti kod sportista zaključeno je sledeće:

- a) Umerena i visoko intenzivna fizička aktivnost statistički značajno ne utiče na DASS-21 skor.

b) Anksioznost izmerena GAD-7 skorom nije bila u statistički značajnoj korelaciji sa umerenom i visoko intenzivnom fizičkom aktivnošću.

c) Nivoi kognitivne preformulacije i emocionalne supresije nisu bili u statistički značajnoj korelaciji ni sa umerenom, kao ni sa visoko intenzivnom fizičkom aktivnošću.

4. Predložene metode i modeli mašinskog učenja bi u budućnosti teorijski mogle biti značajne komponente biomarkera za brzo detektovanje mentalnog distresa kod sportista

7. LITERATURA

1. Abelson JL, Khan S, Liberzon I, Young EA (2007). HPA axis activity in patients with panic disorder: review and synthesis of four studies. *Depress Anxiety* 24(1):66-76.
2. Adams GR, Zaldivar FP, Nance DM, Kodesh E, Radom-Aizik S, Cooper DM (2011). Exercise and leukocyte interchange among central circulation, lung, spleen, and muscle. *Brain Behav Immun* 25:658-666.
3. Adamson BC, Ensari I, Motl RW (2015). Effect of exercise on depressive symptoms in adults with neurologic disorders: A systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil* 96: 1329-1338.
4. Agudelo LZ et al (2014). Skeletal muscle PGC-1alpha1 modulates kynurenine metabolism and mediates resilience to stress-induced depression. *Cell* 159:33-45.
5. Ainsworth B, Cahalin L, Buman M, Ross R (2015). The current state of physical activity assessment tools. *Prog Cardiovasc Dis* 57(4):387-395.
6. Ainsworth BE et al (2011). Compendium of Physical Activities: a second update of codes and MET values. *Med Sci Sports Exerc* 43(8):1575-1581.
7. Akay GG (2022). Telomeres and Psychological Stress: Perspective on Psychopathologies. *Noro Psikiyatrs Ars* 59(4):330-337.
8. Alabert C, Jasencakova Z, Groth A (2017). Chromatin Replication and Histone Dynamics. *Adv Exp Med Biol* 1042:311-333.
9. American College of Sports Medicine (2014). *ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Prescription*. LWW Lippincott Williams and Wilkins
10. American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders: 5th edition (DSM-5)*
11. Anderson RJ, Brice S (2011). The mood-enhancing benefits of exercise: memory biases augment the effect. *Psychol Sport Exerc* 12(2):79-82.
12. Aronowski J, Roy-O'Reilly MA (2019). Neutrophils, the Felons of the Brain. *Stroke* 50(3):42-43.
13. Asimakos A, et al (2018). Immune cell response to strenuous resistive breathing: comparison with whole body exercise and the effects of antioxidants. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 13:529-545.
14. Bahl S, Seto E (2012). Regulation of histone deacetylase activities and functions by phosphorylation and its physiological relevance. *Cell Mol Life Sci* 78(2):427-445.
15. Baidya Kayal E, Kandasamy D, Khare K, Bakhshi S, Sharma R, Mehndiratta A (2021). Texture analysis for chemotherapy response evaluation in osteosarcoma using MR imaging. *NMR Biomed* 34(2):e4426.
16. Bailey MT (2016). Psychological Stress, Immunity, and the Effects on Indigenous Microflora. *Adv Exp Med Biol* 874:225-246.
17. Ballon-Landa E, Parsons JK (2018). Nutrition, physical activity, and lifestyle factors in prostate cancer prevention. *Curr Opin Urol* 28(1):55-61.

18. Bangasser DA, Cuarenta A (2021). Sex differences in anxiety and depression: circuits and mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 22(11):674-684.
19. Barres R et al (2012). Acute exercise remodels promoter methylation in human skeletal muscle. *Cell Metab* 15(3):405-411.
20. Bartlett DB et al (2016). Habitual physical activity is associated with the maintenance of neutrophil migratory dynamics in healthy older adults. *Brain Behav Immun* 56:12-20.
21. Bazaz MR, Balasubramanian R, Monroy-Jaramillo N, Dandekar MP (2021). Linking the Triad of Telomere Length, Inflammation, and Gut Dysbiosis in the Manifestation of Depression. *ACS Chem Neurosci* 12(19):3516-3526.
22. Beaudart C (2017). IOF-ESCEO Sarcopenia Working Group. Nutrition and physical activity in the prevention and treatment of sarcopenia: systematic review. *Osteoporos Int* 28(6):1817-1833.
23. Beharry AW, Judge AR (2015). Differential expression of HDAC and HAT genes in atrophying skeletal muscle. *Muscle Nerve* 52(6):1098-1101.
24. Beiter T et al (2014). Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *J Appl Physiol* (1985) 117(3):325-333.
25. Bernardis E, Castelo-Soccio L (2018). Quantifying Alopecia Areata via Texture Analysis to Automate the SALT Score Computation. *J Investig Dermatol Symp Proc* 19(1):34-40.
26. Bernstein EE, McNally RJ (2017). Acute aerobic exercise helps overcome emotion regulation deficits. *Cogn Emot* 31: 834-843.
27. Besson H et al (2010). Estimating physical activity energy expenditure, sedentary time, and physical activity intensity by self-report in adults. *Am J Clin Nutr* 91(1):106-114.
28. Beurel E, Toups M, Nemeroff CB (2020). The Bidirectional Relationship of Depression and Inflammation: Double Trouble. *Neuron* 107(2):234-256.
29. Bienertova-Vasku J, Lenart P, Scherlinger M (2020). Eustress and Distress: Neither Good nor Bad, but Rather the Same?. *Bioessays* 42(7): e1900238.
30. Bigley AB et al (2014). Phenotype and augments cytotoxicity against lymphoma and multiple myeloma target cells. *Brain Behav Immun* 39:160-171.
31. Bigley AB, Simpson RJ (2015). NK cells and exercise: implications for cancer immunotherapy and survivorship. *Discov Med* 19(107):433-445.
32. Bogdanis GC (2012). Effects of physical activity and inactivity on muscle fatigue. *Front Physiol* 3: 142.
33. Bonanno GA, Burton CL (2013). Regulatory flexibility: An individual differences perspective on coping and emotion regulation. *Perspectives Psychol Sci* 8(6):591-612.

34. Bonnefoy M, Normand S, Pachiaudi C, Lacour JR, Laville M, Kostka T (2001). Simultaneous validation of ten physical activity questionnaires in older men: a doubly labeled water study. *J Am Geriatr Soc* 49(1):28-35.
35. Braunstein LM, Gross JJ and Ochsner KN (2017). Explicit and implicit emotion regulation: A multi-level framework. *Soc Cogn Affect Neurosci* 12: 1545-1557.
36. Bredella MA (2017). Sex Differences in Body Composition. *Adv Exp Med Biol* 1043:9-27.
37. Brijnath B, Croy S, Antoniadou J (2023). Mental Illness. *Anthropology*
38. Bryan C, O'Shea D, Macintyre T (2019). Stressing the relevance of resilience: A systematic review of resilience across the domains of sport and work. *Inter Rev Sport and Exerc Psycho* 12(1):70-111.
39. Budde H et al (2016). The need for differentiating between exercise, physical activity, and training. *Autoimmun Rev* 15: 110-111.
40. Buenrostro JD et al (2018). Integrated Single-Cell Analysis Maps the Continuous Regulatory Landscape of Human Hematopoietic Differentiation. *Cell* 173(6):1535-1548.
41. Calabrese EJ, Mattson MP (2017). How does hormesis impact biology, toxicology, and medicine?. *NPJ Aging Mech Dis* 3(1):13.
42. Cameron LD, Overall NC (2108). Suppression and expression as distinct emotion-regulation processes in daily interactions: Longitudinal and meta-analyses. *Emotion* 18(4):465-480.
43. Campbell JP, Turner JE (2018). Debunking the myth of exercise-induced immune suppression: redefining the impact of exercise on immunological health across the lifespan. *Front Immunol* 9:648.
44. Cannon WB (1935). Stresses and strains of homeostasis. *Am J Med Sci* 189(1):13-14.
45. Cardenas D, Madinabeitia I, Alarcón F, Perales JC (2020). Does Emotion Regulation Predict Gains in Exercise-Induced Fitness? A Prospective Mixed-Effects Study with Elite Helicopter Pilots. *Int J Environ Res Public Health* 17(11):4174.
46. Carstensen JM (1992). Description and simulation of visual texture. Institute of Mathematical Statistics and Operations Research, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark
47. Caspersen CJ, Powell KE, Christenson GM (1985). Physical activity, exercise, and physical fitness: definitions and distinctions for health-related research. *Public Health Rep* 100(2):126-131.
48. Castanheira FV, Kubes (2019). Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood* 133(20):2178-2185.
49. Cavallo AU et al (2021). Texture Analysis in the Evaluation of COVID-19 Pneumonia in Chest X-Ray Images: A Proof of Concept Study. *Curr Med Imaging* 17(9):1094-1102.

50. Cavicchioli M, Scalabrini A, Northoff G, Mucci C, Ogliari A, Maffei C (2021). Dissociation and emotion regulation strategies: A meta-analytic review. *J Psychiatr Res* 143:370-387.
51. Chand SP, Marwaha R (2022). *Anxiety*. StatPearls Publishing
52. Chaput JP et al (2020). WHO guidelines on physical activity and sedentary behaviour for children and adolescents aged 5–17 years: Summary of the evidence. *Int J Behav Nutr Phys Act* 17:141-144.
53. Chen X, Cubillos-Ruiz JR (2020). Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer* 21(2):71–88.
54. Chu B, Marwaha K, Sanvictores T, Ayers D (2022). *Physiology, Stress Reaction*. StatPearls Publishing
55. Cludius B, Mennin D, Ehring T (2020). Emotion regulation as a transdiagnostic process. *Emotion* 20(1):37-42.
56. Cohen S, Miller GE, Rabin BS (2001). Psychological stress and antibody response to immunization: A critical review of the human literature. *Psychosom Med* 63(1): 7–18.
57. Colucci-D'Amato L, Speranza L, Volpicelli F (2020). Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci* 21(20):7777.
58. Cooper ML et al (2020). Redistribution of metabolic resources through astrocyte networks mitigates neurodegenerative stress. *Proc Natl Acad Sci* 117(31):18810–18821.
59. Cree RA, Okoro CA, Zack MM, Carbone E (2020). Frequent Mental Distress Among Adults, by Disability Status, Disability Type, and Selected Characteristics - United States. *Morb Mortal Wkly Rep* 69(36):1238-1243.
60. Curi R et al (2020). The Critical Role of Cell Metabolism for Essential Neutrophil Functions. *Cell Physiol Biochem* 54(4):629-647.
61. Czenczek-Lewandowska E, Leszczak J, Wyszynska J, Baran J, Weres A, Lewandowski B (2022). The Role of Physical Activity in the Reduction of Generalised Anxiety Disorder in Young Adults in the Context of COVID-19 Pandemic. *Int J Environ Res Public Health* 19(17):11086.
62. Da Silveira WA et al (2020). Comprehensive multi-omics analysis reveals mitochondrial stress as a central biological hub for spaceflight impact. *Cell* 183(5):1185–1201.
63. Dantzer R (2108). Neuroimmune Interactions: From the Brain to the Immune System and Vice Versa. *Physiol Rev* 98(1):477-504.
64. Daskalaki MG, Tsatsanis C, Kampranis SC (2018). Histone methylation and acetylation in macrophages as a mechanism for regulation of inflammatory responses. *J Cell Physiol* 233(9): 6495-6507.
65. Davidovic LM, Laketic D, Cumic J, Jordanova E, Pantic I (2021). Application of artificial intelligence for detection of chemico-biological interactions associated with oxidative stress and DNA damage. *Chem Biol Interact* 345:109533.

66. De Francisco C, Arce C, del Pilar Vilchez M, Vales A (2016). Antecedents and consequences of burnout in athletes: perceived stress and depression. *Int J Clin Health Psychol* 16:239-246.
67. De Punder K, Heim C, Wadhwa PD, Entringer S (2019). Stress and immunosenescence: The role of telomerase. *Psychoneuroendocrinology* 101:87-100.
68. Dean J, Keshavan M (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. *Asian J Psychiatr* 27:101-111.
69. Demir et al. (2015). Neutrophil-lymphocyte ratio in patients with major depressive disorder undergoing no pharmacological therapy. *Neuropsychiatr Dis Treat* 11: 2253-2258.
70. Denham et al (2015). Genome-wide sperm DNA methylation changes after 3 months of exercise training in humans. *Epigenomics* 7(5):717 - 731.
71. Dhruv B, Mittal N, Modi M (2019). Study of Haralick's and GLCM texture analysis on 3D medical images. *Int J Neurosci* 129(4):350-362.
72. Dhuli K et al (2022). Physical activity for health. *J Prev Med Hyg* 63(2 Suppl 3):150-159.
73. Di Cataldo S, Ficarra E (2016). Mining textural knowledge in biological images: Applications, methods and trends. *Comput Struct Biotechnol J* 15:56-67.
74. Dincic M et al (2020). The Fractal and GLCM Textural Parameters of Chromatin May Be Potential Biomarkers of Papillary Thyroid Carcinoma in Hashimoto's Thyroiditis Specimens. *Microsc and Microanal* 26(4): 717-730.
75. Doss BL et al (2020). Cell response to substrate rigidity is regulated by active and passive cytoskeletal stress. *Proc Natl Acad Sci* 117(23):12817-12825.
76. Dyreson M, Schultz J (2021). The History of Physical Activity in the Past, Present, and Future of Kinesiology's Big Questions, Hot Topics, and Prospects for Integration. *Kines Rev* 10(3):248-256.
77. Eisma MC, Stroebe MS (2021). Emotion Regulatory Strategies in Complicated Grief: A Systematic Review. *Behav Ther* 52(1):234-249.
78. El Assar M, Alvarez-Bustos A, Sosa P, Angulo J, Rodriguez-Manas L (2022). Effect of Physical Activity/Exercise on Oxidative Stress and Inflammation in Muscle and Vascular Aging. *Int J Mol Sci* 23(15):8713.
79. El-Benna J, Hurtado-Nedelec M, Marzaioli V, Marie JC, Gougerot-Pocidal MA, Dang PM (2016). Priming of the neutrophil respiratory burst: Role in host defense and inflammation. *Immunol Rev* 273(1): 180-193.
80. Elagizi A, Kachur S, Carbone S, Lavie CJ, Blair SN (2020). A Review of Obesity, Physical Activity, and cardiovascular disease. *Curr Obes Rep* 9(4):571-581.
81. Euler M, Hoffmann MH (2019). The double-edged role of neutrophil extracellular traps in inflammation. *Biochem Soc Trans* 47(6):1921-1930.

82. Failde-Garrido JM, Ruiz Soriano L, Simon MA (2022). Levels of Physical Activity and Their Relationship With Motivational Determinants, Self-Regulation, and Other Health-Related Parameters in University Students. *Psychol Rep* 125(4):1874-1895.
83. Faith RE, Murgu AJ, Good RA and Plotnikoff NP (2019). *Cytokines, Stress and Immunity*, 2nd ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
84. Fatima K, Naqvi F, Younas H (2021). A review: Molecular chaperone-mediated folding, unfolding and disaggregation of expressed recombinant proteins. *Cell Biochem Biophys* 79(2): 153-174.
85. Fekri-Ershad S (2019). Pap smear classification using combination of global significant value, texture statistical features and time series features. *Multi Tools and Appl* 78(22):31121-31136.
86. Fink J, Schoenfeld BJ, Nakazato K (2018). The role of hormones in muscle hypertrophy. *Phys Sportsmed* 46(1):129-134.
87. Fischle W, Schwarzer D (2016). Probing Chromatin-modifying Enzymes with Chemical Tools. *ACS Chem Biol* 11(3):689-705.
88. Forte P, Branquinho L, Ferraz R (2022). The Relationships between Physical Activity, Exercise, and Sport on the Immune System. *Int J Environ Res Public Health* 19(11):67-77.
89. Franklin BA et al (2020). Exercise-related acute cardiovascular events and potential deleterious adaptations following long-term exercise training: Placing the risks into perspective—An update: A scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 141:705-736.
90. Friedland W, Kundrat P (2015). Chromosome aberration model combining radiation tracks, chromatin structure, DSB repair and chromatin mobility. *Radiat Prot Dosimetry* 166(1-4):71-74.
91. Galderisi S, Heinz A, Kastrup M, Beezhold J, Sartorius N (2015). Toward a new definition of mental health. *World Psychiatry* 14(2):231-233.
92. Giagulli VA, Castellana M, Pelusi C, Triggiani V (2019). Androgens, Body Composition, and Their Metabolism Based on Sex. *Front Horm Res* 53:18-32.
93. Goldstein DS (2021). Stress and the "extended" autonomic system. *Auton Neurosci* 236:102889.
94. Gordon BR, McDowell CP, Lyons M, Herring MP (2017). The Effects of Resistance Exercise Training on Anxiety: A Meta-Analysis and Meta-Regression Analysis of Randomized Controlled Trials. *Sports Med* 47:2521-2532.
95. Grantham JP, Henneberg M (2014). The estrogen hypothesis of obesity. *PLoS One* 9(6):e99776.
96. Gross JJ (2015). Emotion regulation: Current status and future prospects. *Psychol Inq* 26:1-26.

97. Gross JJ, John PO (2003). Individual differences in two emotion regulation processes: Implications for affect, relationships, and well-being. *J Per Soc Psychol* 85:348-362.
98. Gross JJ, Thompson, RA (2007). Emotion regulation: Conceptual foundations. *Handbook of Emotion Regulation* 1:3-27.
99. Gross, JJ (2014). *Handbook of emotion regulation* (2nd ed.). New York, NY: Guilford Press.
100. Gundersen K (2016). Muscle memory and a new cellular model for muscle atrophy and hypertrophy. *J Exp Biol* 219: 235-242.
101. Guo C, Henley JM (2014). Wrestling with stress: roles of protein SUMOylation and deSUMOylation in cell stress response. *IUBMB Life* 66(2):71-77.
102. Gupta P, Bigley AB, Markofski M, Laughlin M, LaVoy EC (2018). Autologous serum collected 1 h post-exercise enhances natural killer cell cytotoxicity. *Brain Behav Immun* 71:81-92.
103. Gupta S, Savala R, Gupta N, Dey P (2020). Fractal dimension and chromatin textural analysis to differentiate follicular carcinoma and adenoma on fine needle aspiration cytology. *Cytopathology* 31(5): 491-493.
104. Gustafsson H, Madigan DJ, Lundkvist E (2018). "Burnout in athletes". *Hand Stress Sport* 9:489-504.
105. Hagemann T, Levenson RW, Gross JJ (2006). Expressive suppression during an acoustic start. *Psychophysiology* 43(1):104-112.
106. Haralick RM, Shanmugam K, Dinstein IH (1973). Textural features for image classification. *IEEE Trans Syst Man Cybern* 3(6):610-621.
107. Harridge SD, Lazarus NR (2017). Physical Activity, Aging, and Physiological Function. *Physiology* 32(2):152-161.
108. Hatt M, Tixier F, Pierce L, Kinahan PE, Le Rest CC, Visvikis D (2017). Characterization of PET/CT images using texture analysis: the past, the present... any future?. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 44(1):151-165.
109. Hawley JA, Hargreaves M, Joyner MJ, Zierath JR (2014). Integrative biology of exercise. *Cell* 159:738-749.
110. Hayashi T (2015). Conversion of psychological stress into cellular stress response: Roles of the sigma-1 receptor in the process. *Psychiatry Clin Neurosci* 69(4), 179-191.
111. Health and Exercise (1886). *Hall's journal of health* 33(10):284-286.
112. Hergenhan S, Holtkamp S, Scheiermann C (2020). Molecular Interactions Between Components of the Circadian Clock and the Immune System. *J Mol Biol* 432(12):3700-3713.
113. Houtepen LC et al. (2016). Genome-wide DNA methylation levels and altered cortisol stress reactivity following childhood trauma in humans. *Nat Commun* 7:10967.

114. Hu J et al (2020). Increased neutrophil respiratory burst predicts the risk of coronary artery lesion in kawasaki disease. *Front Pediatr* 8:391.
115. Husband A (2020). *Psychoimmunology: Cns Immune Interactions*. New York, USA: Taylor & Francis Group.
116. Huss R, Coupland SE (2020). Software-assisted decision support in digital histopathology. *J Pathol* 250(5):685-692.
117. Ince LM, Weber J, Scheiermann C (2018). Control of Leukocyte Trafficking by Stress-Associated Hormones. *Front Immunol* 9:31-43.
118. Institute of Health Metrics and Evaluation (2022). Global Health Data Exchange (GHDx). (<https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>)
119. Ip KI et al (2021). Emotion expression and regulation in three cultures: Chinese, Japanese, and American preschoolers' reactions to disappointment. *J Exp Child Psychol* 201:104972.
120. IPAQ Research Committee (2005). Guidelines for data processing and analysis of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ)-short and long forms.
121. Ishikawa Y et al (2021). Repeated social defeat stress induces neutrophil mobilization in mice: maintenance after cessation of stress and strain-dependent difference in response. *Br J Pharmacol* 178(4):827-844.
122. Ishikawa Y, Furuyashiki T (2022). The impact of stress on immune systems and its relevance to mental illness. *Neurosci Res* 175:16-24.
123. Iwasaki A, Medzhitov R (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16(4):343-353.
124. Izquierdo M et al (2021). International Exercise Recommendations in Older Adults (ICFSR): Expert Consensus Guidelines. *J Nutr Health Aging* 25(7):824-853.
125. Jacobson EC et al (2018). Migration through a small pore disrupts inactive chromatin organization in neutrophil-like cells. *BMC Biol* 16:142.
126. Jassar S, Adams SJ, Zarzeczny A, Burbridge BE (2022). The future of artificial intelligence in medicine: Medical-legal considerations for health leaders. *Healthc Manage Forum* 35(3):185-189.
127. Jebb AT, Ng V, Tay L (2021). A Review of Key Likert Scale Development Advances: 1995-2019. *Front Psychol* 12:637547.
128. Jefferies P, Ungar M (2020). Social anxiety in young people: A prevalence study in seven countries. *PloS one* 15(9):e0239133.
129. Jensen AE, Niederberger B, Jaworski R, Devaney JM, Turcotte LP, Kelly KR (2019). TNF- α stress response is reduced following load carriage training. *Mil Med* 184(1-2):256-260.
130. Jeong SW et al (2019). Mortality reduction with physical activity in patients with and without cardiovascular disease. *Eur Heart J* 40:3547-3555.

131. Ji C, Yang J, Lin L, Chen S (2022). Physical Exercise Ameliorates Anxiety, Depression and Sleep Quality in College Students: Experimental Evidence from Exercise Intensity and Frequency. *Behav Sci* 12(3):61.
132. Jiang S, Postovit L, Cattaneo A, Binder EB, Aitchison KJ (2019). Epigenetic modifications in stress response genes associated with childhood trauma. *Front Psychiatry* 10:808.
133. Jordanova E et al (2022). The fractal and textural analysis of glomeruli in obese and non-obese patients. *J Pathol Inform* 13:100-108.
134. Jovanovic V, Gavrilov-Jerkovic V, Zuljevic D, Brdaric D (2014). Psihometrijska evaluacija Skale depresivnosti, anksioznosti i stresa-21 (DASS-21) na uzorku studenata u Srbiji. *Psihologija* 47:93-112.
135. Junior NJL, Tertulian WI, Junior VR, Junior OTS, Castro HO, Oliviera V (2022). Any Level of Physical Activity Reduces Depression, Anxiety and Stress in Adults. *Lect Edu Fis Depor* 27:48-64.
136. Kallimasioti-Pazi EM et al (2018). Heterochromatin delays CRISPR-Cas9 mutagenesis but does not influence the outcome of mutagenic DNA repair. *PLoS Biol* 16(12):e2005595.
137. Kalokerinos EK, Greenaway KH, Pedder DJ, Margetts EA (2014). Don't grin when you win: the social costs of positive emotion expression in performance situations. *Emotion* 14(1):180-186.
138. Kandola A, Stubbs B (2020). Exercise and Anxiety. *Adv Exp Med Biol* 1228:345-352.
139. Karakaidos P, Karagiannis D, Rampias T (2020). Resolving DNA Damage: Epigenetic Regulation of DNA Repair. *Molecules* 25(11):2496.
140. Karstoft K, Pedersen BK (2016). Exercise and type 2 diabetes: focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol* 94:146-150.
141. Keilani M et al (2017). Effects of resistance exercise in prostate cancer patients: A meta-analysis. *Support Care Cancer* 25:2953-2968.
142. Kemp GM, Altimimi HF, Nho Y, Heir R, Klyczek A, Stellwagen D (2022). Sustained TNF signaling is required for the synaptic and anxiety-like behavioral response to acute stress. *Mol Psychiatry* 27(11):4474-4484.
143. Khanfer R, Phillips AC, Carroll D, Lord JM (2010). Altered human neutrophil function in response to acute psychological stress. *Psychosom Med* 72(7):636-640.
144. Kim DI, Lee J, Park H, Jeon JY (2020). The relationship between physical activity levels and mental health in individuals with spinal cord injury in South Korea. *Int J Environ Res Public Health* 17(12):4423.
145. Kim E et al (2021). Association of acute psychosocial stress with oxidative stress: Evidence from serum analysis. *Redox Biol* 47:102-138.
146. Kim GM, Lim JY, Kim EJ, Park SM (2019). Resilience of patients with chronic diseases: A systematic review. *Health Soc Care Community* 27(4):797-807.

147. Kim SY, Park JH, Lee MY, Oh KS, Shin DW, Shin YC (2019). Physical activity and the prevention of depression: A cohort study. *Gen Hosp Psychiatry* 60:90-97.
148. Kim YK, Na KS, Myint AM, Leonard BE (2016). The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 64:277-284.
149. Kinoshita M et al (2019). The reduced bactericidal activity of neutrophils as an incisive indicator of waterimmersion restraint stress and impaired exercise performance in mice. *Sci Rep* 9(1):45-62.
150. Kitaoka S (2022). Inflammation in the brain and periphery found in animal models of depression and its behavioral relevance. *J Pharmacol Sci* 148(2):262-266.
151. Knochel C (2012). Cognitive and behavioural effects of physical exercise in psychiatric patients. *Progr Neurobiol* 96:46-68.
152. Kono K et al (2018). Quantitative distinction of the morphological characteristic of erythrocyte precursor cells with texture analysis using gray level co-occurrence matrix. *J Clin Lab Anal* 32(1):e22175.
153. Kuehner C (2017). Why is depression more common among women than among men? *Lancet Psychiatry* 4:146-158.
154. La Gerche A, Heidbuchel H (2104). Can intensive exercise harm the heart? You can get too much of a good thing. *Circulation* 130(12):992-1002.
155. Lahousen T, Kapfhammer HP (2018). Anxiety disorders - clinical and neurobiological aspects. *Psychiatr Danub* 30(4):479-490.
156. Lamper AM, Fleming RH, Ladd KM, Lee ASY (2020). A phosphorylation-regulated eIF3d translation switch mediates cellular adaptation to metabolic stress. *Science* 370(6518):853-856.
157. Lee IM, Hsieh CC, Paffenbarger RS Jr (1995). Exercise intensity and longevity in men. The Harvard Alumni Health Study. *JAMA* 273(15):1179-1184.
158. Li G, He H (2009). Hormesis, allostatic buffering capacity and physiological mechanism of physical activity: A new theoretic framework. *Med Hypotheses* 72(5):527-532.
159. Li H et al (2012). Computerized analysis of mammographic parenchymal patterns on a large clinical dataset of full-field digital mammograms: robustness study with two high-risk datasets. *J Digit imaging* 25:591-598.
160. Lin J, Epel E (2022). Stress and telomere shortening: Insights from cellular mechanisms. *Ageing Res Rev* 73:101507.
161. Liu CH, Stevens C, Wong SH, Yasui M, Chen JA (2019). The prevalence and predictors of mental health diagnoses and suicide among US college students: implications for addressing disparities in service use. *Depress Anxiety* 36(1):8-17.

162. Liu X, Platt C, Rosenzweig A (2017). The Role of MicroRNAs in the Cardiac Response to Exercise. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7(12): a029850.
163. Liverant GI et al (2022). Suppression and acceptance in unipolar depression: Short-term and long-term effects on emotional responding. *Br J Clin Psychol* 61(1):1-17.
164. Locke AB, Kirst N, Shultz CG (2015). Diagnosis and management of generalized anxiety disorder and panic disorder in adults. *Am Fam Physician* 91(9):617-624.
165. Lofstedt T, Brynolfsson P, Asklund T, Nyholm T, Garpebring A (2019). Gray-level invariant Haralick texture features. *PLoS One* 14(2):e0212110.
166. Loomis AL (1889). Rest and Exercise in Heart Disease. *Transactions of the Annual Meeting of the American Climatological Association. American Climatological Association. Annual Meeting 6: 253-268.*
167. Lopez RB et al (2020). Emotion Regulation and Immune Functioning During Grief: Testing the Role of Expressive Suppression and Cognitive Reappraisal in Inflammation Among Recently Bereaved Spouses. *Psychosom Med* 82(1):2-9.
168. Lopez RB, Denny BT, Fagundes CP (2018). Neural mechanisms of emotion regulation and their role in endocrine and immune functioning: A review with implications for treatment of affective disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 95:508-514.
169. Lord JM, Phillips AC, Arlt W (2019). *Synergistic Effects of Aging and Stress on Neutrophil Function.* Cham Berlin: Springer
170. Lovibond, SH, Lovibond PF (1995). *Manual for the Depression Anxiety Stress Scales.* (2nd. Ed.), Sydney, Australia: Psychology Foundation
171. Lowe B et al (2008). Validation and standardization of the Generalized Anxiety Disorder Screener (GAD-7) in the general population. *Med Care* 46(3):266-274.
172. Lu S, Wei F, Li G (2021). The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system. *Cell Stress* 5(6):76-85.
173. Lyle et al (2012). *Team Physician Manual.* 1st edn: Taylor and Francis.
174. Lynall ME (2020). Peripheral Blood Cell-Stratified Subgroups of Inflamed Depression. *Biol Psychiatry* 88(2):185-196.
175. Malhi et al (2014). Unlocking the diagnosis of depression in primary care: which key symptoms are GPs using to determine diagnosis and severity. *Aust NZ J Psychiatry* 48: 542-47.
176. Malhi GS, Mann JJ (2018). Depression. *Lancet* 392 (10161):2299-2312.
177. Malm C, Jakobsson J, Isaksson A (2019). Physical Activity and Sports-Real Health Benefits: A Review with Insight into the Public Health of Sweden. *Sports (Basel)* 7(5):127.
178. Markworth JF, Maddipati KR, Cameron-Smith D (2016). Emerging roles of proresolving lipid mediators in immunological and adaptive responses to exercise-induced muscle injury. *Exerc Immunol Rev* 22:110-134.

179. Maron BJ (2007). Recommendations and considerations related to preparticipation screening for cardiovascular abnormalities in competitive athletes: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on. Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 115:1455-1643.
180. Martinovic T et al (2018). Unusual shape and structure of lymphocyte nuclei is linked to hyperglycemia in type 2 diabetes patients. *Tissue Cell* 52: 92-100.
181. Mason JW (1975). A historical view of the stress field. *J Human Stress* 1(2):22-36.
182. McAllister-Williams RH et al (2020). The identification, assessment and management of difficult-to-treat depression: an international consensus statement. *J Affect Disord* 267:264-282.
183. McEwen BS (2017). Allostasis and the Epigenetics of Brain and Body Health Over the Life Course: The Brain on Stress. *JAMA Psychiatry* 74(6):551-552.
184. McGee SL, Fairlie E, Garnham AP, Hargreaves M (2009). Exercise-induced histone modifications in human skeletal muscle. *J Physiol* 587(Pt 24): 5951-5958.
185. McKim DB, Yin W, Wang Y, Cole SW, Godbout JP, Sheridan JF (2018). Social Stress Mobilizes Hematopoietic Stem Cells to Establish Persistent Splenic Myelopoiesis. *Cell Rep* 25(9):2552-2562.
186. McKinney J, Velghe J, Fee J, Isserow S, Drezner JA (2019). Defining athletes and exercisers. *Am J Cardiol* 123:532-535.
187. McMahan EM et al (2017). Physical activity in European adolescents and associations with anxiety, depression and well-being. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 26(1):111-122.
188. McMahan TP, Naragon-Gainey K (2020). Ecological validity of trait emotion regulation strategy measures. *Psychol Assess* 32(8):796-802.
189. McRae K, Gross JJ (2020). Emotion regulation. *Emotion* 20(1):1-9.
190. Mender I et al (2020). Telomere stress potentiates sting-dependent anti-tumor Immunity. *Cancer Cell* 38(3):400-411.
191. Mendes et al (2018). Metabolic equivalent of task (METs) thresholds as an indicator of physical activity intensity. *PLoS One* 13 (7): e0200701.
192. Mifsud KR, Reul JM (2018). Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of genomic responses to stress in the brain. *Stress* 21(5):389-402.
193. Miller WL (2018). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis: A Brief History. *Horm Res Paediatr* 89(4):212-223.
194. Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Seki S, Saitoh D (2015). Burn-evoked reactive oxygen species immediately after injury are crucial to restore the neutrophil function against postburn infection in mice. *Shock* 44(3):252- 257.

195. Moffitt TE et al (2010). How common are common mental disorders? Evidence that lifetime prevalence rates are doubled by prospective versus retrospective ascertainment. *Psychol Med* 40:899-909.
196. Mognato M, Burdak-Rothkamm S, Rothkamm K (2021). Interplay between DNA replication stress, chromatin dynamics and DNA-damage response for the maintenance of genome stability. *Mutat Res* 787:108-146.
197. Mohiyeddini C, Opacka-Juffry J, Gross JJ (2014). Emotional suppression explains the link between early life stress and plasma oxytocin. *Anxiety Stress Coping* 27(4):466-475.
198. Mok A, Khaw KT, Luben R, Wareham N, Brage S (2019). Physical activity trajectories and mortality: population based cohort study. *BMJ* 365:123-133.
199. Morris JN, Heady JA, Raffle PA, Roberts CG, Parks JW (1953). Coronary heart-disease and physical activity of work. *Lancet* 262(6795):1053-1057.
200. Morrison O, Thakur J (2021). Molecular Complexes at Euchromatin, Heterochromatin and Centromeric Chromatin. *Int J Mol Sci* 22(13):6922.
201. Mroczek DK et al (2015). Emotional Reactivity and Mortality: Longitudinal Findings From the VA Normative Aging Study. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci* 70(3):398-406.
202. Muehlbauer T, Gollhofer A, Granacher U (2015). Associations Between Measures of Balance and Lower-Extremity Muscle Strength/Power in Healthy Individuals Across the Lifespan: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sports Med* 45:1671-1692.
203. Muhlen C (2014). Chronic variable stress activates hematopoietic stem cells. *Nat Med* 20(7):754-758.
204. Muhtadie L, Haase CM, Verstaen A, Sturm VE, Miller BL, Levenson RW (2021). Neuroanatomy of expressive suppression: The role of the insula. *Emotion* (2):405-418.
205. Mulasi U, Kuchnia AJ, Cole AJ, Earthman CP (2015). Bioimpedance at the bedside: current applications, limitations, and opportunities. *Nutr Clin Pract* 30(2):180-193.
206. Nagawa K et al (2021). Texture analysis of muscle MRI: machine learning-based classifications in idiopathic inflammatory myopathies. *Sci Rep* 11(1):9821.
207. Naragon-Gainey K, McMahon TP, Chacko TP (2017). The structure of common emotion regulation strategies: A meta-analytic examination. *Psychol Bull* 143(4):384-427.
208. Navarro C, Lyu J, Katsori AM, Caridha R, Elsassner SJ (2020). An embryonic stem cell-specific heterochromatin state promotes core histone exchange in the absence of DNA accessibility. *Nat Commun* 11(1):5095.
209. Neuffer PD et al (2015). Understanding the Cellular and Molecular Mechanisms of Physical Activity-Induced Health Benefits. *Cell Metab* 22(1):4-11.

210. Nicolaidis NC, Kyratzi E, Lamprokostopoulou A, Chrousos GP, Charmandari E (2015). Stress, the stress system and the role of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 2(1-2):6-19.
211. Nieman DC, Gillitt ND, Sha W (2018a). Identification of a select metabolite panel for measuring metabolic perturbation in response to heavy exertion. *Metabolomics* 14(11):147.
212. Nieman DC, Groen AJ, Pugachev A, Vacca G (2018b). Detection of functional overreaching in endurance athletes using proteomics. *Proteomes* 6:33.
213. Nieman DC, Henson DA, Austin MD, Brown VA (2005). Immune response to a 30-minute walk. *Med Sci Sports Exerc* 37:57-62.
214. Nieman DC, Shanely RA, Gillitt ND, Pappan KL, Lila MA (2013). Serum metabolic signatures induced by a three-day intensified exercise period persist after 14 h of recovery in runners. *J Proteome Res* 12:4577-4584.
215. Nieman DC, Shanely RA, Luo B, Meaney MP, Dew DA, Pappan KL (2014). Metabolomics approach to assessing plasma 13- and 9-hydroxy-octadecadienoic acid and linoleic acid metabolite responses to 75-km cycling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307:68-74.
216. Nieman DC, Wentz LM (2019). The compelling link between physical activity and the body's defense system. *J Sport Health Sci* 8(3):201-217.
217. Nikolovski D, Cumic J, Pantic I (2019). Application of gray level co-occurrence matrix algorithm for detection of discrete structural changes in cell nuclei after exposure to iron oxide nanoparticles and 6-hydroxydopamine. *Microsc Microanal* 25(4):982-988.
218. Niraula A, Witcher KG, Sheridan JF, Godbout JP (2019). Interleukin-6 induced by social stress promotes a unique transcriptional signature in the monocytes that facilitate anxiety. *Biol Psychiatry* 85(8):679-689.
219. Nunes-Silva A et al (2014). Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study. *PLoS One* 9(5):e96464.
220. O'Connor DB, Thayer JF, Vedhara K (2021). Stress and health: A review of psychobiological processes. *Annu Rev Psychol* 72:663-88.
221. O'Keefe EL, Torres-Acosta N, O'Keefe JH, Lavie CJ (2020). Training for Longevity: The Reverse J-Curve for Exercise. *Mo Med* 117(4):355-361.
222. Oaten M, Cheng K (2006). Longitudinal gains in self-regulation from regular physical exercise. *Br J Health Psychol* 11:717-733.
223. Ochsner KN, Silvers JA, Buhle JT (2012). Functional imaging studies of emotion regulation: a synthetic review and evolving model of the cognitive control of emotion. *Ann NY Acad Sci* 1251(1):1-24.
224. Ou X, Pan W, Xiao P (2014). In vivo skin capacitive imaging analysis by using grey level co-occurrence matrix (GLCM). *Int J Pharm* 460:28-32.

225. Pantic I et al (2013). Nuclear entropy, angular second moment, variance and texture correlation of thymus cortical and medullar lymphocytes: grey level co-occurrence matrix analysis. *An Acad Bras Cienc* 85(3):1063-1072.
226. Pantic I et al (2015). Discriminatory ability of fractal and grey level co-occurrence matrix methods in structural analysis of hippocampus layers. *J Theor Biol* 370:151-156.
227. Pantic I et al (2017). Postnatal Developmental Changes in Fractal Complexity of Giemsa-Stained Chromatin in Mice Spleen Follicular Cells. *Microsc Microanal* 23:1024-1029.
228. Pantic I et al (2019). Chromatin textural parameters of blood neutrophils are associated with stress levels in patients with recurrent depressive disorder. *Srp Arh Za Celok Lek* 147(11-12):718-723.
229. Pantic I et al (2020). Gray-level co-occurrence matrix analysis of granule available at neurons of the hippocampal dentate gyrus following cortical injury. *Microsc Microanal* 26(1):166-172.
230. Pantic I, Dimitrijevic D, Nestic D, Petrovic D (2016). Gray level co-occurrence matrix algorithm as pattern recognition biosensor for oxidopamine-induced changes in lymphocyte chromatin architecture. *J Theor Biol* 406:124-128.
231. Pantic I, Pantic S, Paunovic J (2012). Aging increases nuclear chromatin entropy of erythroid precursor cells in mice spleen hematopoietic tissue. *Microsc Microanal* 18(5):1054-1059.
232. Papathanasiou G et al (2009). Reliability measures of the short International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) in Greek young adults. *Hellenic J Cardiol* 50(4):283-94.
233. Park S et al (2014). Texture analyses show synergetic effects of biomechanical and biochemical stimulation on mesenchymal stem cell differentiation into early phase osteoblasts. *Microsc Microanal* 20(1):219-227.
234. Park SC, Kim YK (2020). Anxiety Disorders in the DSM-5: Changes, Controversies, and Future Directions. *Adv Exp Med Biol* 1191:187-196.
235. Parks KR, Davis JM (2012). Epinephrine, cortisol, endotoxin, nutrition, and the neutrophil. *Surg infect* 13(5):300-306.
236. Patel H, Alkhawam H, Madanieh R, Shah N, Kosmas CE, Vittorio TJ (2017). Aerobic vs anaerobic exercise training effects on the cardiovascular system. *World J Cardiol* 9(2):134-138.
237. Paunovic J et al (2021). Effects of Iron Oxide Nanoparticles on Structural Organization of Hepatocyte Chromatin: Gray Level Co-occurrence Matrix Analysis. *Microsc Microanal* 27(4):889-896.
238. Peake J (2013). Interrelations between acute and chronic exercise stress and the immune and endocrine systems. In: Constantini N, Hackney A (eds) *Endocr Phys Activ Sport* 4:258-280.
239. Peake J et al (2004). Changes in neutrophil surface receptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate- and high-intensity exercise. *J Appl Physiol* (1985) 97(2):612-618.

240. Peake JM, Neubauer O, Walsh NP, Simpson RJ (2017). Recovery of the immune system after exercise. *J Appl Physiol* (1985) 122(5):1077-1087.
241. Pearce M et al (2022). Association Between Physical Activity and Risk of Depression: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Psychiatry* 79(6):550-559.
242. Pedersen BK (2017). Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest* 47:600–611.
243. Pedersen BK, Saltin B (2015). Exercise as medicine - evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. *Scand J Med Sci Sports* 25(3):1-72.
244. Pelliccia A et al (2021). 2020 ESC Guidelines on sports cardiology and exercise in patients with cardiovascular disease. *Eur Heart J* 42(1):17–96.
245. Perry CG, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL (2008). High-intensity aerobic interval training increases fat and carbohydrate metabolic capacities in human skeletal muscle. *Appl Physiol Nutr Metab* 33(6):1112-1123.
246. Phillips C (2017). Brain-Derived Neurotrophic Factor, Depression, and Physical Activity: Making the Neuroplastic Connection. *Neural Plast* 17:7260130.
247. Picardi A, Pallagrosi M, Fonzi L, Biondi M (2017). Psychopathological dimensions and the clinician's subjective experience. *Psychiatry research* 258: 407–414.
248. Piercy KL et al (2018). The Physical Activity Guidelines for Americans. *JAMA* 320(19):2020-2028.
249. Poller WC et al (2022). Brain motor and fear circuits regulate leukocytes during acute stress. *Nature* 607(7919):578-584.
250. Popov S, Janicic B, Dinic B (2016). Validacija srpske adaptacije upitnika emocionalne regulacije. *Primenjena psihologija* 9:63-81.
251. Qiu Y et al (2023). Exercise sustains the hallmarks of health. *J Sport Health Sci* 12(1):8-35.
252. Raedeke TD, Smith AL (2001). Development and preliminary validation of an athlete burnout measure. *J Sport Exerc Psychol* 23:281–306.
253. Rahim T, Rashid R (2017). Comparison of depression symptoms between primary depression and secondary-to-schizophrenia depression. *Int J Psychiatry Clin Pract* 21(4):314-317.
254. Ray A, Gulati K, Rai N (2017). Stress, Anxiety, and Immunomodulation: A Pharmacological Analysis. *Vitam Horm* 103:1-25.
255. Roberts BM, Nuckols G, Krieger JW (2020). Sex Differences in Resistance Training: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Strength Cond Res* 34(5):1448-1460.
256. Roberts NA, Levenson RW, Gross JJ (2008). Cardiovascular costs of emotion suppression cross ethnic lines. *Int J Psychophysiol* 70(1):82-87.

257. Rokvić N (2019). Validacija srpske verzije skale generalizovanog anksioznog poremećaja (GAD7) - pilot studija. *Engrami* 41:68-79.
258. Rom O, Reznick AZ (2016). The Stress Reaction: A Historical Perspective. *Adv Exp Med Biol* 905:1-4.
259. Rossetto D, Avvakumov N, Cote J (2012). Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics* 7(10):1098-108.
260. Roufayel R, Kadry S (2019). Molecular chaperone HSP70 and key regulators of apoptosis: A review. *Curr Mol Med* 19(5):315-325.
261. Roy R et al (2021). DNA methylation signatures reveal that distinct combinations of transcription factors specify human immune cell epigenetic identity. *Immunity* 54(11):2465-2480.
262. Sales AJ, Guimaraes FS, Joca SRL (2021). DNA methylation in stress and depression: from biomarker to therapeutics. *Acta Neuropsychiatr* 33(5):217-241.
263. Salinas C et al (2020). Assessment of peripheral blood neutrophil respiratory burst, phagocytosis and apoptosis in obese non-insulin dysregulated horses. *Res Vet Sci* 132:127-132.
264. Samokhvalov IM, Reva VA, Fomin NF, Rasmussen TE (2016). Contributions of the surgeon Nikolai Korotkov (1874-1920) to the management of extremity vascular injury. *J Trauma Acute Care Surg* 80(2):341-346.
265. Santos et al (2014). Reference values for body composition and anthropometric measurements in athletes. *PLoS One* 15;9(5):e97846.
266. Sattler S (2017). The role of the immune system beyond the fight against infection. *Adv Exp Med Biol* 1003:3-14.
267. Savegnago M, Covolo N, Cheli VJ, Jordao JA (2014). Relationship between body composition and level of physical activity among university students. *Rev Chil Nutricion* 41(1):46-53.
268. Schoelz JM, Riddle NC (2022). Functions of HP1 proteins in transcriptional regulation. *Epigenetics Chromatin* 15(1):14.
269. Schuch FB et al (2019). Physical activity protects from incident anxiety: A meta-analysis of prospective cohort studies. *Depress Anxiety* 36:846-58.
270. Schuch FB, Vancampfort D (2021). Physical activity, exercise, and mental disorders: it is time to move on. *Trends Psychiatry Psychother* 43(3):177-184.
271. Selye H (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138 (3479): 2-32.
272. Selye H (1975). Implications of stress concept. *N Y State J Med*. 75(12):2139-2145.
273. Shanely RA, Nieman DC, Henson DA, Jin F, Knab AM, Sha W (2013). Inflammation and oxidative stress are lower in physically fit and active adults. *Scand J Med Sci Sports* 23(2):215-223.

274. Shephard RJ (2003). Limits to the measurement of habitual physical activity by questionnaires. *Br J Sports Med* 37(3):197-206.
275. Shi Y et al (2019). Lactic acid accumulation during exhaustive exercise impairs release of neutrophil extracellular traps in mice. *Front Physiol* 10:709.
276. Siddique J (2020). Individualized Relative-Intensity Physical Activity Accelerometer Cut Points. *Med Sci Sports Exerc* 52(2):398-407.
277. Sies H (2105). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* 4:180-3.
278. Sigma-Aldrich (2014). Giemsa stain (Procedure No. GS-10).
279. Sikka P, Stenberg J, Vorobyev V, Gross JJ (2022). The neural bases of expressive suppression: A systematic review of functional neuroimaging studies. *Neurosci Biobehav Rev* 138:104-108.
280. Silva E, Freire T, Faria S (2018). Concurrent and Lagged Relations between Emotion Regulation and Affect in Adolescents Daily Life. *Span J Psychol* 21:67.
281. Simpson RJ et al (2020). Can exercise affect immune function to increase susceptibility to infection?. *Exerc Immunol Rev* 26:8-22.
282. Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R (2015). Exercise and the regulation of immune functions. *Prog Mol Biol Transl Sci* 135:355-380.
283. Sorman K et al (2022). Measures of emotion regulation: Convergence and psychometric properties of the difficulties in emotion regulation scale and emotion regulation questionnaire. *J Clin Psychol* 78(2):201-217.
284. Spector AA, Kim HY (2015). Discovery of essential fatty acids. *J Lipid Res* 56(1):11-21.
285. Spielman LJ, Little JP, Klegeris A (2016). Physical activity and exercise attenuate neuroinflammation in neurological diseases. *Brain Res Bull* 125:19-29.
286. Spitzer RL, Kroenke K, Williams JBW, Lowe B (2006). A brief measure for assessing generalized anxiety disorder. *Arch Intern Med* 166:1092-1097.
287. Staron RS et al (2000). Fiber type composition of the vastus lateralis muscle of young men and women. *J Histochem Cytochem* 48(5):623-629.
288. Steel et al (2014). The global prevalence of common mental disorders: a systematic review and meta-analysis 1980-2013. *Int J Epidemiol* 43(2):476-493.
289. Stinkens R et al (2018). Exercise training-induced effects on the abdominal subcutaneous adipose tissue phenotype in humans with obesity. *J Appl Physiol* (1985) 125(5):1585-1593.
290. Stojmenović M, Milosavljević M (2017). Attitudes of students to physical activity. *Racionalna terapija* 9:29-38.
291. Strath SJ et al (2013). Guide to the assessment of physical activity: Clinical and research applications: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 128(20):2259-2279.

292. Surace AEA, Hedrich CM (2019). The Role of Epigenetics in Autoimmune/Inflammatory Disease. *Front Immunol* 10:15-25.
293. Sylvia LG, Bernstein EE, Hubbard JL, Keating L, Anderson EJ (2014). Practical guide to measuring physical activity. *J Acad Nutr Diet* 114(2):199-208.
294. Syu GD, Chen HI, Jen CJ (2012). Differential effects of acute and chronic exercise on human neutrophil functions. *Med Sci Sports Exerc* 44(6):1021-1027.
295. Talapko J et al (2021). Mental health and physical activity in health-related university students during the COVID-19 pandemic. *Healthcare (Basel)* 9(7):801.
296. Tang X, Yang Y, Huang L, Qiu L (2022). The Application of Texture Feature Analysis of Rectus Femoris Based on Local Binary Pattern (LBP) Combined With Gray-Level Co-Occurrence Matrix (GLCM) in Sarcopenia. *J Ultrasound Med* 41(9):2169-2179.
297. Teich T, Zaharieva DP, Riddell MC (2019). Advances in Exercise, Physical Activity, and Diabetes Mellitus. *Diabetes Technol Ther* 21(1):112-122.
298. Telecan T et al (2022). More than Meets the Eye: Using Textural Analysis and Artificial Intelligence as Decision Support Tools in Prostate Cancer Diagnosis-A Systematic Review. *J Pers Med* 12(6):983.
299. The IPAQ Group (2015). Guidelines for Data Processing and Analysis of the International Physical Activity Questionnaire
300. Thompson NM, Uusberg A, Gross JJ, Chakrabarti B (2019). Empathy and emotion regulation: An integrative account. *Prog Brain Res* 247:273-304.
301. Thompson WR, Sallis R, Joy E, Jaworski CA, Stuhr RM, Trilk JL (2020). Exercise Is Medicine. *Am J Lifestyle Med* 14(5):511-523.
302. Tian J et al (2022). Experience of physical activity in patients with COPD: A systematic review and qualitative meta-synthesis. *Geriatr Nurs* 47:211-219.
303. Tian J, Yu H, Austin L (2022). The Effect of Physical Activity on Anxiety: The Mediating Role of Subjective Well-Being and the Moderating Role of Gender. *Psychol Res Behav Manag* 15:3167-3178.
304. Topalovic N et al (2021). Association between Chromatin Structural Organization of Peripheral Blood Neutrophils and Self-Perceived Mental Stress: Gray-Level Co-occurrence Matrix Analysis. *Microsc Microanal* 27(5): 1202-1208.
305. Tsai SJ (2021). Role of interleukin 8 in depression and other psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 106:110-173.
306. Tsukita K, Sakamaki-Tsukita H, Takahashi R (2022). Long-term Effect of Regular Physical Activity and Exercise Habits in Patients With Early Parkinson Disease. *Neurology* 98(8):859-871.

307. Valacchi G, Virgili F, Cervellati C, Pecorelli A (2018). OxInflammation: from subclinical condition to pathological biomarker. *Front Physiol* 9:858.
308. Vaughan RS, Edwards EJ, MacIntyre TE (2020). Mental health measurement in a post Covid-19 world: psychometric properties and invariance of the DASS-21 in athletes and non-athletes. *Front Psychol* 11:590-559.
309. Veenith T et al (2022). High generation of reactive oxygen species from neutrophils in patients with severe COVID-19. *Sci Rep* 12(1):104-184.
310. Verhoeven JE, Revesz D, van Oppen P, Epel ES, Wolkowitz OM, Penninx BW (2015). Anxiety disorders and accelerated cellular ageing. *Br J Psychiatry* 206(5):371-378.
311. Verkuijl SA, Rots MG (2019). The influence of eukaryotic chromatin state on CRISPR-Cas9 editing efficiencies. *Curr Opin Biotechnol* 55:68-73.
312. Vitlic A, Lord JM, Phillips AC (2014). Stress, ageing and their influence on functional, cellular, and molecular aspects of the immune system. *Age* 36(3):9631.
313. Wager TD, Davidson ML, Hughes BL, Lindquist MA, Ochsner KN (2008). Neural mechanisms of emotion regulation: evidence for two independent prefrontal-subcortical pathways. *Neuron* 59(6):1037-1050.
314. Walsh NP (2011). Position statement. Part one: immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 17:6-63.
315. Walter P, Ron D (2011). The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science* 334(6059):1081-1086.
316. Wang J, Liu S, Li G, Xiao J (2020). Exercise Regulates the Immune System. *Adv Exp Med Biol* 1228:395-408.
317. Wang K, Li Y, Zhang T, Luo J (2022). The Relationship among College Student's Physical Exercise, Self-Efficacy, Emotional Intelligence, and Subjective Well-Being. *International journal of environmental research and public health* 19(18):115-196.
318. Wang W, Meng ZQ, Shi FX (2012). Modification and biological role of histone. *Yi Chuan* 34(7):810-818.
319. Wang W, Min L, Tian P, Wu C, Liu J, Hu XH (2022). Analysis of polarized diffraction images of human red blood cells: a numerical study. *Biomed Opt Express* 13(3):1161-1172.
320. Wasfy MM, Baggish AL (2016). Exercise Dose in Clinical Practice. *Circulation* 133(23):2297-2313.
321. Weber H (1918). On the influence of muscular exercise on longevity. *Br Med J* 1(2982):228-229.
322. Weber MD, Godbout JP, Sheridan JF (2017). Repeated Social Defeat, Neuroinflammation, and Behavior: Monocytes Carry the Signal. *Neuropsychopharmacology* 42(1):46-61.

323. Wedell-Neergaard AS et al (2018). Cardiorespiratory fitness and the metabolic syndrome: roles of inflammation and abdominal obesity. *PLoS One* 13:e0194991.
324. Weilenmann S, Schnyder U, Parkinson B, Corda C, Von Kaenel R, Pfaltz MC (2018). Emotion transfer, emotion regulation, and empathy-related processes in physician-patient interactions and their association with physician well-being: a theoretical model. *Front Psychiatry* 9:389.
325. Weiner JS, Lourie JA (1981). *Practical human biology*, Academic Press, London.
326. Westerterp KR (2017). Doubly labelled water assessment of energy expenditure: principle, practice, and promise. *Eur J Appl Physiol* (1985) 117(7):1277-1285.
327. Westerterp KR (2018). Exercise, energy balance and body composition. *Eur J Clin Nutr* 72(9):1246-1250.
328. White RL, Babic MJ, Parker PD, Lubans DR, Astell-Burt T, Lonsdale C (2107). Domain-Specific Physical Activity and Mental Health: A Meta-analysis. *Am J Prev Med* 52(5):653-666.
329. Wilder RP, Greene JA, Winters KL, Long WB, Gubler K, Edlich RF (2006). Physical fitness assessment: an update. *J Long Term Eff Med Implants* 16(2):193-204.
330. Wohleb ES, Powell ND, Godbout JP, Sheridan JF (2013). Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior. *J Neurosci* 33(34):13820-13833.
331. Wohlgemuth KJ, Arieta LR, Brewer GJ, Hoselton AL, Gould LM, Smith-Ryan AE (2021). Sex differences and considerations for female specific nutritional strategies: a narrative review. *J Int Soc Sports Nutr* 18(1):27.
332. World Health Organization (2016). *Out of the shadows: Making mental health a global development priority*
333. World Health Organization (2017). *Depression and other common mental disorders: global health estimates*
334. World Health Organization (2020). *WHO Guidelines on physical activity and sedentary behaviour*
335. Wu J et al (2022). Relationship between Physical Activity and Emotional Regulation Strategies in Early Adulthood: Mediating Effects of Cortical Thickness. *Brain Sci* 12(9):1210.
336. Xiao, J. (2020). *Physical Exercise for Human Health*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1228:Springer
337. Xu R, Li C, Liu X, Gao S (2021). Insights into epigenetic patterns in mammalian early embryos. *Protein Cell* 12(1):7-28.
338. Yamamoto M et al (2017). Quantitative Distinction of Morphological Characteristics of White Blood Cells in Peripheral Blood Through Texture Analysis Using Gray Level Co-Occurrence Matrix. *Clinical laboratory* 63(11): 1851-1868.

339. Yamamoto S, Hotta K, Ota E, Mori R, Matsunaga A (2016). Effects of resistance training on muscle strength, exercise capacity, and mobility in middle-aged and elderly patients with coronary artery disease: A meta-analysis. *J Cardiol* 68:125-134.
340. Yang WL, Zhu F, Chen WX (2022). Texture analysis of contrast-enhanced magnetic resonance imaging predicts microvascular invasion in hepatocellular carcinoma. *Eur J Radiol* 156:110528.
341. Yang X et al (2012). Ultrasound GLCM texture analysis of radiation-induced parotid-gland injury in head-and-neck cancer radiotherapy: an in vivo study of late toxicity. *Med Phys* 39(9):5732-5739.
342. Yuan J, Liu Y, Ding N, Yang J (2014). The regulation of induced depression during a frustrating situation: benefits of expressive suppression in Chinese individuals. *PLoS One* 9(5):e97420.
343. Zaccagni L, Barbieri D, Gualdi-Russo E (2014). Body composition and physical activity in Italian university students. *J Transl Med* 12:120-121.
344. Zahedi A et al (2018). Deep Analysis of Mitochondria and Cell Health Using Machine Learning. *Sci Rep* 8(1):16354.
345. Zaletel I, Milošević N, Todorović V, Kovačević-Filipović M, Puškaš N (2016). Fractal and gray level co-occurrence matrix texture analysis of senescent and non-senescent deciduous teeth stem cells: A pilot study. *Fract Geo Anal Med Biol* 2(2):1-6.
346. Zefferino R, Di Gioia S, Conese M (2021). Molecular links between endocrine, nervous, and immune system during chronic stress. *Brain Behav* 11(2):e01960.
347. Zhang X, Cui J, Wang W, Lin C (2017). A Study for Texture Feature Extraction of High-Resolution Satellite Images Based on a Direction Measure and Gray Level Co-Occurrence Matrix Fusion Algorithm. *Sensors (Basel)* 17(7):1474.
348. Zhang Y et al (2021). Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol* 1283:1-16.
349. Zhang Z et al (2022). The roles of exercise tolerance and resilience in the effect of physical activity on emotional states among college students. *Int J Clin and Health Psychol* 22(3):100-312.
350. Zhao S, Allis CD, Wang GG (2021). The language of chromatin modification in human cancers. *Nat Rev Cancer* 21(7):413-430.
351. Zhou K, Gaullier G, Luger K (2019). Nucleosome structure and dynamics are coming of age. *Nat Struct Mol Biol* 26(1):3-13.

SPISAK SKRAĆENICA

PTM: Post-translacione modifikacije

HDAC: Histon deacetilaza

HATs: Histon acetiltransferaza

GLCM: Gray Level Co-occurrence Matrix (matrica ko-pojavljivanja sivih vrednosti)

ASM: Angular second moment (angularni drugi momenat)

IDM: Inverse difference moment (inverzni momenat razlike)

MET: Metabolički ekvivalent

FA: Fizička aktivnost

VO₂ max: Maksimalna potrošnja kiseonika

HHN: Hipotalamus-hipofizno-nadbubrežna osovina

cAMP: Ciklični adenzin monofosfat

CON: GLCM kontrast

COR: GLCM korelacija

VAR: GLCM varijansa

IPAQ: International Physical Activity Questionnaire (Međunarodni upitnik o fizičkoj aktivnosti)

MET.min.ned⁻¹: MET minuta nedeljno

MET.h.ned⁻¹: MET sati nedeljno

MSE: mean squared error (srednja kvadratna greška)

RKV: reaktivne kiseoničke vrste

PODACI O PUBLIKOVANIM RADOVIMA IZ DISERTACIJE

Topalovic N, Mazic S, Nestic, D, Vukovic O, Cumic J, Laketic D, Stasevic Karlicic I, Pantic I. Association between Chromatin Structural Organization of Peripheral Blood Neutrophils and Self-Perceived Mental Stress: Gray-Level Co-occurrence Matrix Analysis. *Microscopy and Microanalysis*, Cambridge University Press 2021; 27 (5): 1202–1208. (kategorija M21; IF: 4.099). doi: 10.1017/s143192762101240x

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Nikola Topalović rođen je 21.04.1986. godine u Šapcu, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu je završio u Šapcu. Upisao je Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu školske 2005/06. godine. Diplomirao je juna 2012. godine sa prosečnom ocenom 8,81 (8 i 81/100). U januaru 2013. je položio stručni ispit za doktora medicine. Od oktobra 2013. do oktobra 2015. godine bio je zaposlen na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ kao specijalizant dečije hirurgije. Od oktobra 2015. godine zaposlen je na Institutu za Medicinsku fiziologiju Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, najpre kao saradnik u nastavi, a od jula 2017. godine u zvanju asistenta. Doktorske akademske studije, modul Primenjena istraživanja u medicini sporta i motornim veštinama upisao je školske 2016/17. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Master akademske studije na studijskom programu Fizička aktivnost, zdravlje i terapija vežbanjem upisao je školske 2016/17. godine, a završni master rad pod nazivom „Program pravilno doziranog fizičkog vežbanja u redukciji gojaznosti“ odbranio je u septembru 2019. godine. Specijalističke akademske studije na studijskom programu Medicinske nauke, modul Medicina sporta upisao je školske 2018/19. godine, a završni specijalistički akademski rad pod nazivom „Iznenadna srčana smrt kod sportista“ odbranio je u septembru 2021. godine. U aprilskom upisnom roku, školske 2016/17 god., upisao je zdravstvenu specijalizaciju iz oblasti Medicina sporta, a specijalistički ispit iz Medicine sporta položio u julu 2019. godine sa odličnom ocenom (5) i stekao zvanje Specijalista medicine sporta.

Dr Nikola Topalović je doktor ragbi reprezentacije Srbije od 2013. godine, i predsednik lekarske komisije nacionalne ragbi lige, a od 2015. do 2019. je bio doktor seniorskog tima rukometnog kluba „Crvena Zvezda“. Od 2017. do 2021. godine je bio saradnik tima za terapiju srčane insuficijencije Instituta za kardiovaskularne bolesti „Dedinje“. Angažovan je kao odgovorni doktor za medicinska pitanja tokom međunarodnih košarkaških takmičenja u organizaciji internacionalne košarkaške asocijacije FIBA (Federation Internationale de Basketball). Usavršavao se u zemlji i inostranstvu (Petomesečno usavršavanje na Univerzitetu „Foro Italico“ u Rimu, u oblasti sportske medicine u okviru Erasmus+ mobility KA107 projekta 2018-1-IT02-KA107-047556 u saradnji sa Olimpijskim komitetom Italije).

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: Nikola Topalović
Broj indeksa 2016/5104

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

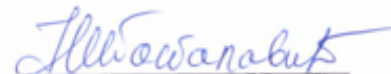
POVEZANOST STRUKTURNE ORGANIZACIJE HROMATINA
NEUTROFILNIH GRANULOCITA PERIFERNE KRVI, MENTALNOG
DISTRESA I INTENZITETA FIZIČKE AKTIVNOSTI SPORTISTA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,

07.07.2023.

Potpis autora



Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Nikola Topalović

Broj indeksa: 2016/5104

Studijski program: Primenjena istraživanja u medicini sporta i motornim veštinama

Naslov rada: POVEZANOST STRUKTURNE ORGANIZACIJE HROMATINA NEUTROFILNIH GRANULOCITA PERIFERNE KRVI, MENTALNOG DISTRESA I INTENZITETA FIZIČKE AKTIVNOSTI SPORTISTA

Mentor: Prof. dr Igor Pantić

Komentor: Prof dr Olivera Vuković

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,

07.07.2023.

Potpis autora



Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

POVEZANOST STRUKTURNE ORGANIZACIJE HROMATINA NEUTROFILNIH GRANULOCITA PERIFERNE KRVI, MENTALNOG DISTRESA I INTENZITETA FIZIČKE AKTIVNOSTI SPORTISTA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)
 2. Autorstvo - nekomercijalno (CC BY-NC)
 3. **Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade (CC BY-NC-ND)**
 4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
 5. Autorstvo - bez prerade (CC BY-ND)
 6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)
- (Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.
Kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Beogradu,

Potpis autora

07.07.2023.

