

Д.И. Осолодкин: Коэффициент r_2 (стр. 8) относится к обучающей выборке?

Р.П. Терехов: Большое спасибо за проявленный интерес к нашей работе и положительный отзыв о нашей идее! Постараюсь ответить на Ваш вопрос.

Для расчета фрактальной размерности использовали монохроматизированные микрофотографии, снятые на микроскопе Axiovert S 100 при увеличении в 400 раз.

Расчеты проводились в программе FDim. На исследуемой микрофотографии выбирался участок с четким изображением субстанции, после чего программа запускает алгоритм box-counting. В основе данного метода расчета лежит уравнение Минковского для фрактальной размерности:

$$D = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\epsilon)}{\log \frac{1}{\epsilon}} = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\epsilon)}{-\log \epsilon}$$

где ϵ – диаметр участка, подвергнутого анализу, а $N(\epsilon)$ – число элементов, помещённых в данный диаметр. Данное уравнение можно преобразовать в формулу прямой зависимости логарифма количества элементов от логарифма диаметра участка:

$$D_{bc} = \frac{\log N(\epsilon)}{\log \frac{1}{\epsilon}} \Leftrightarrow D_{bc} \log \frac{1}{\epsilon} = \log N(\epsilon) \Leftrightarrow D_{bc} \log \frac{1}{\epsilon} - \log N(\epsilon) = 0$$

В ходе расчета программа FDim постепенно уменьшает площадь выбранного участка, одновременно подсчитывая количество темных пикселей внутри анализируемой области. Результаты расчета выстраиваются на графике зависимости количества элементов от диаметра участка, после чего аппроксимируется в прямую линию с известными $N(\epsilon)$ и ϵ , что позволяет вычислить искомую фрактальную размерность.

Коэффициент корреляции для линии, выстраиваемой FDim, обычно превышает 0,99. Учитывая, что на достоверность результатов влияет качество микрофотографии, и степень освещённости изображения, и область анализируемого участка (даже небольшое смещение области может изменить результат расчета на несколько десятых), то на микрофотографиях анализу обязательно подвергалось от двух (для ДКВ) до пяти (для БФ) различных участков на микрофотографии. Более того, анализ каждого образца проводился на нескольких изображениях. Таким образом, удавалось минимизировать ошибку метода (до 2-3%). Более подробно с валидационными характеристиками расчетов для образцов ДКВ Вы можете ознакомиться в нашей статье «Fractal Aggregation of Dihydroquercetin After Lyophilization» (DOI: 10.1007/s12247-018-9322-4).

Дмитрий, надеюсь, мой ответ удовлетворил Вас. Если у Вас возникнут дополнительные вопросы – с большим удовольствием продолжу нашу online дискуссию.

В.Ю. Григорьев: Какой метод использовался для расчета фрактальной поверхности?

Р.П. Терехов: Расчеты проводились в программе FDim. На исследуемой микрофотографии выбирался участок с четким изображением субстанции, после чего программа запускает алгоритм box-counting. В основе данного метода расчета лежит уравнение Минковского для фрактальной размерности:

$$D = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\epsilon)}{\log \frac{1}{\epsilon}} = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\epsilon)}{-\log \epsilon}$$

где ϵ – диаметр участка, подвергнутого анализу, а $N(\epsilon)$ – число элементов, помещённых в данный диаметр. Данное уравнение можно преобразовать в формулу прямой зависимости логарифма количества элементов от логарифма диаметра участка:

$$D_{bc} = \frac{\log N(\epsilon)}{\log \frac{1}{\epsilon}} \Leftrightarrow D_{bc} \log \frac{1}{\epsilon} = \log N(\epsilon) \Leftrightarrow D_{bc} \log \frac{1}{\epsilon} - \log N(\epsilon) = 0$$

В ходе расчета программа FDim постепенно уменьшает площадь выбранного участка, одновременно подсчитывая количество темных пикселей внутри анализируемой области. Результаты расчета выстраиваются на графике зависимости количества элементов от диаметра участка, после чего аппроксимируется в прямую линию с известными $N(\epsilon)$ и ϵ , что позволяет вычислить искомую фрактальную размерность.

В.Ю. Григорьев: Единицы измерения растворимости (весовые или молярные)? - (стр. 8)

Р.П. Терехов: Весовые (г/мл).

В.Ю. Григорьев: Коэффициент r^2 (стр. 8) относится к обучающей выборке?

Р.П. Терехов: Да.

В.Ю. Григорьев: Величина ошибки при экспериментальном определении D_c ?

Р.П. Терехов: Коэффициент корреляции для линии, выстраиваемой F_{Dim} , обычно превышает 0,99. Учитывая, что на достоверность результатов влияет качество микрофотографии, и степень освещенности изображения, и область анализируемого участка (даже небольшое смещение области может изменить результат расчета на несколько десятых), то на микрофотографиях анализу обязательно подвергалось от двух (для ДКВ) до пяти (для БФ) различных участков на микрофотографии. Более того, анализ каждого образца проводился на нескольких изображениях. Таким образом, удавалось минимизировать ошибку метода (до 2-3%). Более подробно с валидационными характеристиками расчетов для образцов ДКВ Вы можете ознакомиться в нашей статье «Fractal Aggregation of Dihydroquercetin After Lyophilization» (DOI: 10.1007/s12247-018-9322-4)

В.Ю. Григорьев: Обычно для регрессионных QSPR моделей приводят статистические характеристики r^2 , rmse (train, cv, test), у Вас они почему-то отсутствуют (стр. 9)

Р.П. Терехов: Вениамин Юрьевич, большое спасибо за ценное замечание – оно позволит нам улучшить качество нашей работы в будущем!

В.Ю. Григорьев: Почему величины фрактальной размерности приведены с точностью 4 знака после запятой? - (стр. 10)

Р.П. Терехов: Поскольку значение фрактальной размерности оказалось достаточно чувствительным к изменению свойств субстанций, то данное разрешение оказалось необходимым и достаточным для целей нашего исследования. Тем более, что в ходе исследования наблюдаемые зависимости с фрактальной размерностью подчинялась логарифмической прогрессии, поэтому в пересчете на число элементов погрешность в логарифме могла сыграть важную роль.

В.Ю. Григорьев: Чем F_d отличается от D_c ? - (стр. 11)

Р.П. Терехов: Это опечатка: D_c и F_d – различные варианты, принятые для обозначения фрактальной размерности.

Р.П. Терехов: Вениамин Юрьевич, надеюсь, мои ответы удовлетворили Вас. Если у Вас возникнут дополнительные вопросы – охотно продолжу нашу online дискуссию.

В.Ю. Григорьев: Роман Петрович, частично я удовлетворен Вашими ответами, но, тем не менее, есть замечания:

- 1) с физико-химической точки зрения в качестве единиц измерения активности(свойства) нужно использовать молярные величины;
- 2) приводимая Вами точность определения величин фрактальной размерности (3, 4 знака после запятой) не соответствует действительности: Вы сами указываете в качестве ошибки метода 2-3%, т.е. в лучшем случае нужно указывать D_c с двумя знаками после запятой.

П. Полищук: Есть один общий вопрос, относящийся к Вашей презентации. Уверен его уже задавали Вам другие рецензенты. Как Вы поясняете существование установленной корреляции? Есть ли механистическое объяснение наблюдаемой закономерности? Ведь корреляцию можно найти между разными явлениями, но это не всегда означает причинно-следственную связь. Пробовали ли Вы найти более простые дескрипторы для данных систем, которые обеспечили бы такую же высокую корреляцию? Ведь без сравнения с какими-то другими подходами, сложно оценить значимость и успешность ваших моделей.

Когда-то давно, мой бывший руководитель занимался чем-то подобным. Фракталы это интересная математическая модель, находящая отражение в природе, но их использование для решения прикладных задач химии и биологии может быть довольно затруднительным, т.к. надо доказать их

преимущества перед обычными методами. А учитывая, что фрактальные дескрипторы неинтерпретируемы, любая модель (даже линейная регрессия) становится черным ящиком, что в отсутствие явных преимуществ в точности прогноза делает не рациональным использование таких моделей. Вот если бы, модели на фракталах решали какой-то круг задач с точностью, превосходящей все другие методы, тогда они могли бы занять свою нишу. Если Вам удастся ее найти, будет очень здорово.

Р.П. Терехов: Большое спасибо за проявленный интерес к нашей работе и положительный отзыв о нашей идее! Извините, что заставил Вас так долго ждать с обратным письмом! Постараюсь ответить на Ваши вопросы. Наша исследовательская группа считает, что все зависит от конкретного случая. В случае с ДКВ, мы полагаем, что ведущим фактором, определяющим различия исследуемых образцов, залучается в границе раздела фаз, а точнее – в поверхностях анализируемых субстанций. Известно, что свойства молекул на границе раздела фаз несколько отличаются от молекул внутри фазы, что обусловлено различным окружением молекул. В то же время, используя различные технологические подходы (описанные в нашей статье «Fractal Aggregation of Dihydroquercetin After Lyophilization» - DOI: 10.1007/s12247-018-9322-4), удалось увеличить площадь поверхности раздела фаз. За счет этого различные лиофилизаты ДКВ по-разному растворялись при прочих равных условиях. В то же время, увеличение площади сопровождалось изменением фрактальности данных поверхностей. Важно отметить, что фрактальные объекты с размерностью между 2 и 3, по сути, являются промежуточными системами между плоским 2D и объемным миром 3D. Очевидно, что при одинаковом размере сторон площадь поверхности 3D объекта всегда больше, чем у 2D. Поэтому мы наблюдаем данную зависимость: чем выше фрактальность лиофилизатов ДКВ, тем выше их растворимость. В то же время, в случае с ББ все несколько иначе. Мы рассматривали свойства лиофилизатов ББ, хранящиеся в ненадлежащих условиях (50 °С) в зависимости от времени пребывания в этих условиях. Лيوфилизаты ББ представляют собой живые культуры лактобактерий, которые, при не соблюдении условий хранения, могут изменить качественный и количественный состав микроорганизмов. Разумеется, развитие новых колоний бактерий скажется на текстуре поверхности лиофилизатов БФ, что нам удалось отследить при помощи фрактальной размерности. В то же время, жизнедеятельность микроорганизмов приводит к закислению среды, что было подтверждено потенциометрией дисперсий на базе этих лиофилизатов. Таким образом, удалось установить зависимость между фрактальной размерностью поверхности лиофилизатов ББ и значением pH дисперсий на их основе. В итоге, действительно, в данных случаях можно говорить о наличии косвенных причинно-следственных связей и наблюдаемые зависимости физико-химических параметров субстанций, скорее являются различными отражениями изменений, происходящих в анализируемых субстанциях.

П. Полищук: Пробовали ли Вы найти более простые дескрипторы для данных систем, которые обеспечили бы такую же высокую корреляцию?

Р.П. Терехов: Павел, большое спасибо за этот вопрос. Честно сказать, пока мы подобные расчеты не проводили и даже не думали о них, но Ваше предложение очень ценное и мы обязательно будем работать в этом направлении.

П. Полищук: «...в отсутствие явных преимуществ в точности прогноза делает не рациональным использование таких моделей. Вот если бы, модели на фракталах решали какой-то круг задач с точностью, превосходящей все другие методы, тогда они могли бы занять свою нишу».

Р.П. Терехов: Павел, обратите внимание на слайд 11, где представлены две зависимости для лиофилизатов ББ: фрактальной размерности от времени ненадлежащего хранения и значения pH от времени ненадлежащего хранения. На данный момент потенциометрия рекомендована нормативной документацией для контроля качества лиофилизатов ББ и это – самый экспрессный тест для данной субстанции (все остальные методы являются микробиологическими и занимают от 3 до 7 дней). Как Вы можете видеть из графика, фрактальная размерность оказалась более чувствительной к условиям хранения, чем значение pH. Мы полагаем, что данный метод может стать математической базой для нового неразрушающего метода контроля качества фармацевтических субстанций, что особенно актуально для биотехнологических препаратов, таких как ББ.

Павел, надеюсь, мои ответы удовлетворили Вас. Если у Вас возникнут дополнительные вопросы – с большим удовольствием продолжу нашу online дискуссию.

Р.Г. Ефремов: Какие именно данные микроскопии использовали для расчета фрактальной размерности?

Р.П. Терехов: Для расчета фрактальной размерности использовали монохроматизированные микрофотографии, снятые на микроскопе Axiovert S 100 при увеличении в 400 раз.

Р.Г. Ефремов: На каком принципе подобный расчет основан?

Р.П. Терехов: Расчеты проводились в программе FDim. На исследуемой микрофотографии выбирался участок с четким изображением субстанции, после чего программа запускает алгоритм box-counting. В основе данного метода расчета лежит уравнение Минковского для фрактальной размерности:

$$D = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\epsilon)}{\log \frac{1}{\epsilon}} = \lim_{\epsilon \rightarrow 0} \frac{\log N(\epsilon)}{-\log \epsilon}$$

где ϵ – диаметр участка, подвергнутого анализу, а $N(\epsilon)$ – число элементов, помещённых в данный диаметр. Данное уравнение можно преобразовать в формулу прямой зависимости логарифма количества элементов от логарифма диаметра участка:

$$D_{bc} = \frac{\log N(\epsilon)}{\log \frac{1}{\epsilon}} \Leftrightarrow D_{bc} \log \frac{1}{\epsilon} = \log N(\epsilon) \Leftrightarrow D_{bc} \log \frac{1}{\epsilon} - \log N(\epsilon) = 0$$

В ходе расчета программа FDim постепенно уменьшает площадь выбранного участка, одновременно подсчитывая количество темных пикселей внутри анализируемой области. результаты расчета выстраиваются на графике зависимости количества элементов от диаметра участка, после чего аппроксимируется в прямую линию с известными $N(\epsilon)$ и ϵ , что позволяет вычислить искомую фрактальную размерность.

Р.Г. Ефремов: Погрешности (например, на слайде 10 приведены 4 (!) значащих цифры после запятой!)?

Р.П. Терехов: Коэффициент корреляции для линии, выстраиваемой FDim, обычно превышает 0,99. Однако достоверность результатов отдельного расчета, действительно, вызывает сомнения. Играет роль и качество микрофотографии, и степень освещённости изображения, и область анализируемого участка – даже небольшое смещение области может изменить результат расчета на несколько десятых. Поэтому на микрофотографиях анализу обязательно подвергалось от двух (для ДКВ) до пяти (для БФ) различных участков на микрофотографии. Более того, анализ каждого образца проводился на нескольких изображениях. Таким образом, удавалось минимизировать ошибку метода (до 2-3%). Более подробно с валидационными характеристиками расчетов для образцов ДКВ Вы можете ознакомиться в нашей статье «Fractal Aggregation of Dihydroquercetin After Lyophilization» (DOI: 10.1007/s12247-018-9322-4).

Р.Г. Ефремов: Из данных на слайде 6 непонятно, как количественно обработать изображения, чтобы получить S».

Р.П. Терехов: Растворимость (S) образцов определялась экспериментально согласно методике Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания.

Р.Г. Ефремов: «...изображения монохроматизированы». Речь о монохроматизации?»

Р.П. Терехов: Вы абсолютно правы – большое спасибо, что заметили эту опечатку!.

Р.Г. Ефремов: Как численно ... оценивали Dс?

Р.П. Терехов: Это тоже опечатка: Dс и Fd – различные варианты, принятые для обозначения фрактальной размерности.

Р.Г. Ефремов: В каких единицах измеряли Dс?

Р.П. Терехов: Фрактальная размерность является безразмерной величиной.

Р.Г. Ефремов: Почему абсолютная погрешность указана в %?

Р.П. Терехов: Очередная опечатка: в таблице представлена относительная погрешность.

Р.Г. Ефремов: «...в данном представлении не вижу корреляции между сплошной и пунктирной кривыми»

Р.П. Терехов: В данном случае мы рассматривали свойства лиофилизатов ББ, хранящиеся в ненадлежащих условиях (50 °С,) в зависимости от времени пребывания в этих условиях (Т). Анализировалось два параметра: фрактальная размерность и значение рН дисперсии на основе данного лиофилизата: мы наблюдаем, что, по мере увеличения времени пребывания лиофилизата в ненадлежащих условиях оба значения растут, правда значение рН растет по линейной зависимости, а фрактальная размерность увеличивается в логарифмической формуле. Поэтому мы построили зависимость фрактальной размерности от значения рН, и коэффициент корреляции для данной зависимости составил 0,9483, представленный на экране.

Роман Гербертович, надеюсь, мои ответы удовлетворили Вас. Если у Вас возникнут дополнительные вопросы – с большим удовольствием продолжу нашу online дискуссию.