



---

Charles University Faculty of Science

# Structural and Chemical Aspects of Calcium Phosphate Formation in Tooth Enamel

---

Summary of the Ph.D. Thesis

Anna Kallistová



CHARLES UNIVERSITY, FACULTY OF SCIENCE  
UNIVERZITA KARLOVA, PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

INSTITUTE OF GEOCHEMISTRY, MINERALOGY AND MINERAL  
RESOURCES

ÚSTAV GEOCHEMIE, MINERALOGIE A NEROSTNÝCH ZDROJŮ

SUMMARY OF THE PH.D. THESIS/AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE



Mgr. Anna KALLISTOVÁ

## Structural and Chemical Aspects of Calcium Phosphate Formation in Tooth Enamel

Strukturní a chemické aspekty vzniku fosfátů  
vápníku v zubní sklovině

Supervisor/Školitel: RNDr. Roman SKÁLA, Ph.D.

Consultant/Konzultant: prof. RNDr. Ivan HORÁČEK, CSc.

Ph.D. study program/Doktorský studijní program: Geology/Geologie

Prague, 2017



# Abstract

Tooth enamel is the hardest and most resistant highly mineralized inorganic component in mammalian bodies that significantly affects both the life quality and expectancy of an individual. Its specific qualitative properties are given by the biomineralization process responsible for its formation. In this process the mineralization of hydroxyapatite (HAp), the only inorganic phase composing the mammalian hard tissues, is controlled by activity of enamel-forming cells ameloblasts and their products. Over the past years, the studies of enamel matrix proteins, their structure, composition and function has become the prevalent field of experimental investigation. However, unique enamel qualities, which enable the teeth to withstand high pressure and stress demands, cannot be accurately assessed without the thorough systematical study of its mineral compound.

In this thesis, I focus on the crystallographic and compositional characteristics of enamel hydroxyapatite and their influence on the mechanical properties of teeth. Obtained results are discussed in context of developmental and adaptation dynamics of mammalian species. The main aspect of the work is to extend our knowledge about the protein-mediated mineralization process from the perspective of inorganic compound and its contribution to the unique characteristics of the tooth.

Special attention is devoted to the proper sample preparation technique for X-ray powder diffraction analysis. It is demonstrated that the inappropriate treatment of specimen causes formation of extra phases. Moreover, the used preparation technique might affect the microstructural properties of the hydroxyapatite crystals, especially the length of crystallites. I propose that the manual disintegration technique using a piston to crack the tooth into fragments, subsequent separation of potential enamel fragments under an optical microscope, and a final confirmation of the purity of enamel using a scanning electron microscope is the most suitable separation technique. This approach enables yielding the most reliable data for biomineralization-focused research.

In the second project presented in the thesis, micro- and macro-structural changes are correlated with mechanical properties variations during the maturation stage of amelogenesis in selected parts of a miniature pig's tooth. The crystallization and maturation processes start at the boundary of enamel and dentine beneath the future cusp at the

anterior part of the tooth. It then spreads toward the roots following the border line of enamel and dentine, surface and posterior parts of the tooth. The late secretory and early maturation stage is characterized by the formation of enamel prisms. During that period, the crystallites gradually thicken. The late maturation stage is associated with a development of interprismatic enamel, abrupt decrease in amount of lattice imperfections in the crystal structure, and rapid settling of the final mechanical properties. The delayed formation of interprismatic enamel is an essential adaptive pattern of a swine developmental dynamics.

I further studied the qualitative characteristics of swine dental enamel (i.e. degree of surface wear, chemical composition variations, and microstructural and mechanical properties) and their relationship to the duration of crystallization developmental process and the age dependency. The results suggest that the longer the crystallization process, the bigger crystallite sizes with lower amount of lattice distortions are formed. This aspect has a significant influence on the final mechanical behaviour of the tooth. Moreover, the inner structure of crystals seems to be immutable with age of the animal.

In summary, a set of these data provides a reliable basis for a multifactorial analysis of functional correlates of particular crystallographic variables and their odontogenetic and phylogenetic representation. The results illustrate that the crystallographic characteristics of enamel hydroxyapatite are a significant contribution to the final qualitative enamel characteristics and they must be taken into account in the studies of biomineralization processes.

# Abstrakt

Zubní sklovina představuje nejtvrđší a nejodolnějši vysoce mineralizovanou anorganickou složku v tělech savců, která významně ovlivňuje kvalitu a délku života. Její charakteristické kvalitativní vlastnosti jsou ustaveny během bio-mineralizačního procesu, při kterém je vytvořena. Při tomto procesu je mineralizace hydroxyapatitem (HAp), jedinou anorganickou fází přítomnou v tvrdých tkáních savců, řízena aktivitou sklovinu-formujících buněk – ameloblastů – a jejich produktů. V posledních letech se stalo hlavní oblastí výzkumu zubní skloviny právě studium matrixových bílkovin, jejich struktury, složení a funkce. Nicméně, jedinečné vlastnosti skloviny umožňující zubu odolávat velkým tlakovým a zátěžovým nárokům nemohou být posuzovány s velkou přesností bez důkladného a systematického studia její minerální složky. V této tezi se soustředí uji na popis krystalografických charakteristik a trendů chemického složení sklovinových hydroxyapatitů a jejich vlivu na mechanické vlastnosti zubu. Získané výsledky jsou diskutovány v kontextu vývojové a adaptační dynamiky savců. Hlavním cílem této práce je rozšířit znalosti o proteiny řízených mineralizačních procesech z pohledu anorganické složky a jejich podílu na vytvoření unikátních mechanických vlastností zubu.

Zvláštní pozornost byla věnována vytvoření správné techniky přípravy vzorků pro práškovou rentgenovou difrakční analýzu. Je prokázáno, že nevhodné zacházení se vzorky způsobuje krystalizaci dalších ve sklovině se normálně nevyskytujících fází. Navíc, nevyhovující technika přípravy může negativně ovlivňovat mikrostrukturní vlastnosti HAp krystalů, a to zejména délku jejich krystalitů. Výsledky experimentů ukazují, že nevhodnějši technikou je mechanická dezintegrace vzorku na fragmenty, následná separace případných fragmentů skloviny v optickém mikroskopu a konečné potvrzení čistoty vzorku skenovacím elektronovým mikroskopem. Tento postup je nejspolehlivějšim způsobem k získání smysluplných dat pro výzkum zaměřený na bio-mineralizační procesy.

V druhém projektu této práce jsou porovnávány změny v mikro- a makro-strukturních parametrech s variacemi mechanických vlastností skloviny v průběhu maturační fáze amelogeneze a ve vybraných částech zubu miniaturního prasete. Krystalizační i maturační procesy začínají na rozhraní skloviny a zuboviny v místě pod budoucím hrbolkem v anteriorní oblasti zubu. Oba procesy se šíří směrem ke kořenům podél

hraniční linie skloviny a zuboviny, dále pak směrem k povrchu zubu a k posteriorním oblastem. Pozdní sekreční a časná maturační fáze jsou charakteristické produkcí sklovinových prismat. Během těchto stádií se krystality HAp postupně prodlužují. Pozdní maturační fáze je spojena s tvorbou interprismatické části skloviny, náhlým poklesem v množství mřížových poruch krystalové mřížky a dosažením konečných mechanických vlastností zubu. Zpožděná tvorba interprismatické skloviny je základním adaptačním motivem dynamiky vývoje prasečích zubů.

Dále jsem studovala vztah délky vývojových krystalizačních procesů a kvalitativních charakteristik prasečí skloviny (tj. stupeň povrchového opotřebení - otěr, variace chemického složení, mikro-strukturních a mechanických vlastností) a jejich závislost na stáří zubu. Výsledky ukazují, že čím delší je proces krystalizace skloviny během vývojových stádií zubu, tím je dosaženo větších velikostí krystalitů s nižším množstvím strukturních defektů v krystalové mříži. Tento jev významně ovlivňuje konečné mechanické chování zubu. Kromě toho, vnitřní struktura hydroxyapatitových krystalů je neměnná se stářím jedince.

Celkově soubor těchto výsledků poskytuje spolehlivý základ pro multifaktoriální analýzu funkčních korelátů příslušných krystalografických proměnných a jejich odontogenetické a fylogenetické reprezentace. Dále ukazují jak významný vliv mají krystalografické charakteristiky sklovinového hydroxyapatitu na unikátní vlastnosti dospělé skloviny. Krystalografické vlastnosti HAp by tak vždy měly být zohledňovány při studiích biomineralizačních procesů.



# Contents

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Materials and Methods</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Results and Discussion</b>	<b>6</b>
3.1	Influence of Sample Preparation on the Microstructure of Tooth Enamel Apatite . . . . .	6
3.2	Mammalian Enamel Maturation: Crystallographic Changes Prior to Tooth Eruption . . . . .	7
3.3	Enamel Crystallinity: a Significant Component of the Mammalian Dental Adaptations . . . . .	8
<b>4</b>	<b>Conclusions</b>	<b>10</b>
<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Materiály a Metodika</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Výsledky a Diskuze</b>	<b>18</b>
3.1	Vliv přípravy vzorku na mikrostrukturu apatitu zubní skloviny . . . . .	18
3.2	Maturace savčí skloviny: krystalografické změny předcházející prořezání zubu . . . . .	19
3.3	Krystalinita skloviny: významná součást savčí zubní adap- tace . . . . .	20
<b>4</b>	<b>Závěry</b>	<b>22</b>
	<b>Bibliography/Literatura</b>	<b>24</b>

# Chapter 1

## Introduction

Enamel, the hardest tissue in animal body that provide a strong protective covering for the teeth, represents an outstanding biomineralizing system. Study of this unique tissue connects diverse scientific areas to resolve the mystery of the principles of biological mineralization and its influence on the exceptional enamel properties. In the last few decades, our understanding of the complexity of odontogenesis have been improved through the development of the new imaging, spectroscopic and other analytical methods. This provides a wealth of information not only about the behaviour of tooth-forming cells during all stages of embryonic development, extracellular matrix components, chromosomal gene localization and patterns of protein expression, and mechanisms preserving the suitable extracellular environment for proper hydroxyapatite mineralization, but also about the paleontological and evolutionary aspects. Type and quality of nutrition of the individuals, social teeth diseases, the pathways of development of the tooth shape, morphology, and architecture according to their ultimate function are one of the most widely studied fields of adaptive odontogenesis.

Modern society has an ever growing need for technological development of biomaterials with composition and structure similar to enamel that will be suitable for dental filling, dental implant or as a self-mineralization-induced agent, because the enamel has no regenerative abilities like bone and dentine. The closer the restorative and implant material will be to the natural enamel, the better mechanical, aesthetic and functional qualities of the whole tooth will be ensured. The development of such a materials unconditionally requires a complete understanding of the mechanisms of biomineralization. The secret of biolo-

---

gically induced and driven enamel mineralization is in a cooperation of ameloblasts and secreted enamel matrix proteins (e.g. amelogenin, ameloblastin, enamelin) with the mineral compounds. This seems to be a crucial factor of amelogenesis. It is not surprising that the current research is primarily focused on a detailed understanding of this remarkable mechanism of interaction of the mineral phase with the organic matrix (Aoba et al., 1987; Fincham et al., 1994; Iijima et al., 2001; Robinson, 2007; Margolis et al., 2014). Over the last few years significant progress has been made in terms of understanding the structure, composition, gene localization, spatiotemporal secretion localization, and a respective function of enamel matrix proteins (Moradian-Oldak et al., 1998; Fincham et al., 1999; Iwasaki et al., 2005; Margolis et al., 2006; Holcroft and Ganss, 2011; Moradian-Oldak, 2012; Ganss and Abbarin, 2014; Ruan and Moradian-Oldak, 2015). The knowledge we have now of the organic compounds contributing to enamel formation provides a valuable base for our understanding of amelogenesis. However, the mineral phase hydroxyapatite (HAp), which forms more than 95% of mature enamel, has been studied solely in the sense of chemical component distribution (Shaw and Yen, 1972; Young, 1974; Elliott et al., 1985; Simmer and Fincham, 1995), size of the crystallites (Jensen and Möller, 1948; Daculsi and Kerebel, 1978; Cuisinier et al., 1993), changes in lattice parameters or bond lengths due to the variations in chemical composition (Elliott, 1964, 1994), types of lattice defects (Cuisinier et al., 1990), and distribution of mineral density (Robinson et al., 1995). There had been few attempts to inquire into the changes in particular chemical compounds and the growth of crystallites during the individual stages of amelogenesis (Weatherell et al., 1975; Daculsi and Kerebel, 1978; Robinson et al., 1995), nevertheless the crystallographic characteristics of HAp phase have not been interfaced with the mechanism of amelogenesis and evolutionary aspects so far.

The X-ray powder diffraction (XRD) is an effective tool for determination of the crystal structure properties. With the advances in new crystallographic softwares (Rodríguez-Carvajal, 1993; Larson and Von Dreele, 2000; Petříček et al., 2014), not only information about lattice parameters, peak intensity, position and width, atoms coordinates, and bond lengths, but also a thorough analysis of crystallite size and microstrain can be obtained. In addition, the calculations of anisotropic properties of both microstructure parameters were implemented into Rietveld and LeBail refinements (Lutterotti et al., 1992; Rodríguez-Carvajal, 2001). The characterization of HAp crystallite size in enamel

---

using XRD has been adopted many times (Jensen and Möller, 1948; Trautz et al., 1953; Grove et al., 1972), nevertheless the accurate crystallite anisotropic delineation and microstrain determination using whole pattern fitting methods has not been carried out. Moreover, there are still major gaps in order to understand how are the microstructural HAp properties influenced by the odontogenetic processes and how their variations might affect the final enamel qualities.

The goal of this research is to characterize the structural and microstructural features of tooth HAp by whole pattern fitting methods, their effect on mechanical properties of enamel, and variations in chemical/phase composition and discuss them in context of amelogenesis and mammalian evolution trends. Furthermore, for precise XRD analysis, examine various sample preparation techniques and show their influence on the microstructural properties. This novel approach will ultimately enable scientists to understand the biomineralization processes within the enamel from the perspective of inorganic compound. Moreover, this might provide a guidance for better characterization of newly developed biomimetic materials not only in terms of macrostructural description of enamel (the proper formation of prisms and crystals) but also from the inner structural crystal characteristics that effect the overall qualities of enamel. Last but not least, this study potentially has significant impact on the perception of amelogenesis and its adaptation on the functional demands and food requirements of individual teeth.

## Chapter 2

# Materials and Methods

For all three research projects I used a miniature pigs as an animal model provided by the Institute of Animal Physiology and Genetics in Liběchov. The Liběchov minipigs were originally mixed by Hormel and Göttingen boars and sows imported from Hormel Institute (University of Minnesota) and Institute for Animal Breeding and Genetics (University of Göttingen, Germany) in 1967. In subsequent years, several additional Göttingen boars had been brought to control through the continuous selection the body shape, animal health, white skin color enabling the study of epidermal stem cells (Motlík et al., 2007), and to increase the average litter size (about 6-10 piglets). The sexual maturity of individuals is reached at approximately 4–5 months of age when the average weight is around 12–15 kg. The weight of adult individuals can vary between 40-120 kg (Vodička et al., 2005; Baxa et al., 2013; Schramke et al., 2015).

Upper and lower jaws were extracted from the 24 sacrificed animals and all six mandibular molars were used for our studies. In one case, the particular individual's teeth were excluded from the research because of the presence of large amount of tartar and also potential signs of tooth decay. All the molar samples were first documented using an optical microscope equipped with digital camera. Selected parts of the enamel of each molar was fragmented, grounded under acetone and used for the purposes of XRD and FTIR analysis. Rest of the sample was embedded in epoxy resin.

The chemical composition was determined using energy-dispersive X-ray spectroscopy. The spectra were collected in high vacuum at 20kV and at working distance of 8-10 mm with an energy-dispersive spectro-

---

meter Bruker Quantax 200 attached to a scanning electron microscope (SEM) Tescan Vega3 XM. SEM in the secondary or backscattered electron mode with the same measurement conditions was also used to take images of macrostructural arrangement of enamel. For the chemical composition analysis, the polished samples were carbon sputtered and for macrostructural imaging the polished and also acid etched samples (3% HCl) sputtered with gold were used.

The X-ray powder diffraction measurements (XRD) were used to characterize the structural and microstructural parameters of the enamel HAp. They were performed using a Bruker D8 Discover diffractometer equipped with a linear LynxEye detector and a germanium primary monochromator providing  $\text{CuK}_{\alpha 1}$  radiation ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ ). Data were collected in the wide range of  $2\theta$  with a small step size of 0.013-0.015 and a counting time ranging from five to seven seconds at each step depending on the needs of particular project. Le Bail whole-pattern fitting and microstructural calculations were accomplished using the FullProf software program (Rodríguez-Carvajal, 2001).

The infrared spectra were recorded using transmission technique (KBr pellets) on a Nicolet 6700 FTIR spectrometer with  $2 \text{ cm}^{-1}$  resolution and Happ-Genzel apodization in the  $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$  region. The width of infrared spectra (FWHM) reflects the combination of the relative particle size of the crystals and the local atomic order. To obtain the pure contribution of crystal atomic order the great attention has been paid to the sample preparation technique with respect to Asscher et al. (2011) and Poduska et al. (2011). The FWHM and infrared splitting factor (IRSF), a direct indicator of atomic order, or the “crystallinity index,” was then calculated according to Weiner and Bar-Yosef (1990).

Micromechanical properties were characterized by an instrumented microindentation hardness tester (Micro-Combi Tester; CSM Instruments, Switzerland). For each specimen, at least 10 indentations were carried out per each cut surface and selected location. In each selected location, the indents were made in the same distance from the enamel-dentine junction or the surface. The indentations were performed with a Vickers indenter (diamond square pyramid, angle between two non-adjacent faces  $136^\circ$ ) with specific measurement parameters for each project. The curves showing applied force ( $F$ ) vs. penetration depth ( $h$ ) were used to calculate indentation hardness ( $H_{IT}$ ), indentation modulus ( $E_{IT}$ ), indentation creep ( $C_{IT}$ ), and the elastic part of the indentation work ( $\eta_{IT}$ ) using software Indentation 5.18 (CSM Instruments, Switzerland) according to the theory of Oliver and Pharr (2004).

# Chapter 3

## Results and Discussion

In this chapter, I present three projects that I performed in the course of my Ph.D. research and that were published or submitted to international renowned journals. The main goals, questions and basic summary of the results of my work are highlighted in the following sections.

### 3.1 Influence of Sample Preparation on the Microstructure of Tooth Enamel Apatite

The structural study of enamel using XRD or TEM methods may provide essential information about the behaviour of HAp crystals during odontogenesis and its contribution to the unique qualities of mature enamel. For such a purpose, several sample preparation techniques have been adopted to separate the pure enamel from dentine. This step is crucial because both tissue develops by distinct processes and thus result in quite different structural, compositional and qualitative properties. However, no systematic study of the potential artifacts or disruptions caused by tissue preparation has been introduced. In this project, six mostly used sample enamel separation techniques (i.e. manual disintegration in a piston, drilling the dentine or enamel with/without cooling medium using rotary drill, nitrogen shock fracturing, and deproteination in hydrazine hydrate) were applied.

Pure enamel is composed exclusively by HAp with an admixture of organic residues. The inappropriate separation technique affects the

### 3.2. MAMMALIAN ENAMEL MATURATION: CRYSTALLOGRAPHIC CHANGES PRIOR TO TOOTH ERUPTION

---

specimen by thermal stresses or by chemical reactions with hydrazine hydrate forming other mineral phases. It is shown that even when using a cooling medium to reduce the temperature during drilling the artificial phases are present. Moreover, the crystallite size and shape of pure HAP is strongly influenced by used separation technique. These results suggest the importance of careful and adequate sample preparation not only for later precise characterization of microstructural properties but also for other studies covering phase or chemical composition determination.

**This work has been published as:** Kallistová A., Skála R., Horáček I., Miyajima N. and Maláková R. (2015). Influence of Sample Preparation on the Microstructure of Tooth Enamel Apatite, *J. Appl. Cryst.* **48**, 763–768.

## 3.2 Mammalian Enamel Maturation: Crystallographic Changes Prior to Tooth Eruption

Here, I introduce project which analyzes in detail the growth of crystallites and variations in microstrain and mechanical properties during the maturation stage of amelogenesis. Moreover, this project comes up with new theory about the sequence of enamel macrostructure formation and put it into context with evolutionary trends.

The basic knowledge about the embryonic tooth development has been derived mainly from the studies on human and rodent models. Both orders (i.e. *Primates* and *Rodentia*) belongs to the evolutionary highly derived mammalian groups not only in terms of dental macro-structural patterns formed according to functional demands but also in other phylogenetic aspects. With respect to the prior studies of tribosphenic molar (Osborn, 1907; Evans and Sanson, 2003; Špoutil et al., 2010; Davis, 2011), I decided to use a miniatur pig animal model that is closer to this ancestral tooth type to assess the similarities and distinctions of enamel development between mammalian counterparts. Moreover, due to the large thickness of swine molar, I was able to follow the gradual progress of amelogenesis within different parts of one tooth.

My results suggest that the crystal thickness, which has not been determined before, varies depending on its distance from EDJ. These crystals, observable by SEM, are composed of several crystallites according to the crystallographic notation (Klug and Alexander, 1974) that should



be considered as a basic structural units (cf. the structural levels defined by Koenigswald and Clemens (1992)). The terms crystal and crystallite are often used interchangeably. I want to underline my belief that crystallite is a structural sub-unit of crystal that refers to the inner structural properties of the crystal.

The lateral fusion of individual Hap crystallites was originally presented as a process responsible for thickening of the prisms and a main reason for enamel hardness establishment (Robinson et al., 1989). The systematic study of crystallite growth and also of mechanical properties variations during the maturation stage of amelogenesis suggests that crystallite thickening is a gradual process (no lateral fusions) and that the final mechanical properties of swine enamel are connected with the delayed formation of interprismatic enamel. Precisely this time lag in interprismatic enamel formation is according to my observation an essential difference between swine and higher mammalian evolutionary levels of tooth enamel.

**This work has been published as:** Kallistová A., Horáček I., Šlouf M., Skála R. and Fridrichová M. (2017). Mammalian Enamel Maturation: Crystallographic Changes Prior to Tooth Eruption. *PLoS ONE*. **12**, e0171424.

### 3.3 Enamel Crystallinity: a Significant Component of the Mammalian Dental Adaptations

I further studied the relationship of the degree of enamel surface wear, amelogenesis/calcification duration and the microstructural HAp parameters using miniature pig model. In this project, the effect of different crystallite sizes, microstrain and crystallinity onto the final enamel quality is emphasized.

I compared chemical composition, microstructural, structural and mechanical properties of three molar types (i.e. first, second and third molar within the same dentition), teeth providing the same biting function having various time span of amelogenesis. This enabled me to determine directly the mutual connections between those parameters and their dependency on the length of calcification processes without the influence of other especially biological variables.

I can summarize that the chemical composition and lattice para-

### 3.3. ENAMEL CRYSTALLINITY: A SIGNIFICANT COMPONENT OF THE MAMMALIAN DENTAL ADAPTATIONS

---

meters display no correlation with any other qualitative or quantitative factors. The HAp crystallite size and stiffness of enamel increase accompanied by a significant drop in relative amount of lattice imperfections as well as in elastic part of indentation work with respect to the duration of mineral compound calcification during the amelogenesis. Same correlations were observed using red deers model. This suggest a general behaviour of prolonged calcification and thus an adaptation predetermination for the qualitative demands especially tooth wear resistance. Moreover, the inner structure of HAp is not age dependent.

**This work was submitted for publication as:** Kallistová A., Skála R., Šlouf M., Čejchan P., Matulková I. and Horáček I. (2017). Enamel Crystallinity: a Significant Component of the Mammalian Dental Adaptations. Submitted to *Scientific Reports*.

# Chapter 4

## Conclusions

This PhD. thesis shows that the crystallographic characterization using whole pattern fitting methods and the investigation of chemical and phase composition of the animal hard tissues contributes to our understanding of qualitative behaviour of inorganic body compounds namely hydroxyapatite. In addition, the presented results give evidence about the relationship between these characteristics and the mechanism of amelogenesis and its adaptation on the functional demands of the tooth.

In search of the most suitable sample preparation technique of the pure enamel, I found that:

- An inappropriate preparation techniques influence the shape of crystallite mainly in the (001) direction.
- Effect of the strain is insignificant considering the fact that calculated strain values vary within computed errors.
- New phases appear due to the temperature increase when drilling or due to the chemical reaction with hydrazine hydrate during deproteination.
- Mechanical separation is most suitable as it leads to results agreeing most with previous experimental data.

The study of maturation stage of amelogenesis from the perspective of inorganic compound brought the following findings:

- Enamel maturation and crystallite growth are gradual processes that start beneath the future molar cusp at the enamel-dentine

---

junction of the mesial tooth part, and then spread toward the roots and distal direction.

- Rapid elongation of HAp crystallites during the secretory stage is replaced by slow gradual crystallite thickening, which does not suggest the lateral fusion of individual crystallites.
- HAp crystal is an aggregate composed of 2 or 3 sub-units (i.e. crystallites).
- During the appositional growth of HAp, crystal microstructure relaxes (density of lattice imperfections rapidly decreases).
- Crystallization of interprismatic enamel comes after formation of prism scaffold, this is considered as an apomorphic character of mammals with tooth close to ancestral tooth types (i.e. tribosphenic molar).
- Characteristic qualitative features of adult enamel are achieved after the interprismatic part is formed.
- Miniature pig's third molar reaches full maturity at around 26 months of animal life.

I finally demonstrated that the enamel structural and microstructural characteristics play a significant role in mammalian dental adaptations. It was shown that:

- Crystallite size increases and microstrain decreases together with improvement of crystallinity and mechanical properties with longer developmental mechanism, i.e. duration of enamel mineralization influences its microstructural characteristics, which are reflected in the resulting enamel quality and resistance.
- The above mentioned results should be considered as a general behaviour of prolonged amelogenesis of the majority of mammalian species.



# Kapitola 1

## Úvod

Sklovina, nejtvrdsí tkáň v tělech zvířat poskytující silnou ochrannou a krycí funkci zubům, představuje význačný bio-mineralizační systém. Tato jedinečná tkáň spojuje rozličné vědecké oblasti, aby společně rozluštily záhadu principů biologicky indukované a řízené mineralizace a její vliv na výjimečné vlastnosti skloviny. V posledních desetiletích se naše porozumění složitým procesům odontogeneze prohloubilo díky vývoji nových zobrazovacích, spektroskopických a dalších analytických metod. Tyto nové techniky poskytují nepřehledné množství informací nejen o chování zub-tvořících buněk během všech stádií embryonálního vývoje zubu a složek mezibuněčné matrix, o lokalizaci genů na chromozomu a procesech bílkovinné exprese, a konečně o mechanismech zajišťujících vhodné mezibuněčné prostředí pro mineralizaci hydroxyapatitů, ale také o paleontologických a evolučních trendech. Nejvíce studovanými oblastmi adaptivní odontogeneze pak jsou typ a kvalita výživy jedince, sociální zubní choroby, cesty postupného vývoje tvaru zubů, jejich morfologie a vnitřní architektury v návaznosti na jejich konečnou funkci.

Protože sklovina nemá regenerativní schopnosti jako kost a zubovina, má moderní společnost stále rostoucí potřebu technologického vývoje nových biomateriálů svým složením a strukturou podobných sklovině, které budou vhodné pro použití při výplních zubů, jako zubní implantáty nebo jako mineralizaci-indukující činidla. Čím podobnější bude regeneraci-indukující materiál či implantát přírodní sklovině, tím zajistíme lepší mechanické, estetické a funkční kvality celého zubu. Vývoj takových materiálů bezpodmínečně vyžaduje úplné porozumění mechanismům bio-mineralizačních procesů. Biologicky indukovaná a řízená mineralizace skloviny je založena na spolupráci ameloblastů a jimi vylučovaných bílko-

---

vin (tj. amelogeninu, ameloblastinu, enamelinu, a dalších) s minerálními složkami. Tento mechanismus je pravděpodobně klíčovým faktorem amelogeneze. Proto není žádným překvapením, že současný výzkum je primárně zaměřen na detailní porozumění tohoto pozoruhodného procesu interakce minerální fáze s organickou matrix (Aoba et al., 1987; Fincham et al., 1994; Iijima et al., 2001; Robinson, 2007; Margolis et al., 2014). Během posledních několika málo let bylo dosaženo významného pokroku ve smyslu porozumění struktuře, složení, genové lokalizaci a časoprostorovému uspořádání proteinové sekrece a příslušné funkci sklovinových matrixových bílkovin (Moradian-Oldak et al., 1998; Fincham et al., 1999; Iwasaki et al., 2005; Margolis et al., 2006; Holcroft and Ganss, 2011; Moradian-Oldak, 2012; Ganss and Abbarin, 2014; Ruan and Moradian-Oldak, 2015). Znalosti, které nyní máme o organických složkách přispívajících do tvorby skloviny, poskytují hodnotný základ pro naše porozumění amelogenezi. Avšak, minerální fáze - hydroxyapatit, který tvoří více než 95% dospělé skloviny, byl studován výhradně ve smyslu distribuce chemického složení (Shaw and Yen, 1972; Young, 1974; Elliott et al., 1985; Simmer and Fincham, 1995), velikosti krystalitů (Jensen and Möller, 1948; Daculsi and Kerebel, 1978; Cuisinier et al., 1993), změn mřížkových parametrů či délek vazeb v závislosti na variacích chemického složení (Elliott, 1964, 1994), typů mřížových defektů (Cuisinier et al., 1990) a distribuce minerální hustoty (Robinson et al., 1995). V minulosti bylo několik pokusů zkoumat změny chemického složení HAp a růstu krystalitů během jednotlivých stádií amelogeneze (Weatherell et al., 1975; Daculsi and Kerebel, 1978; Robinson et al., 1995), nicméně krystalografické charakteristiky HAp fáze nebyly doposud úzce propojeny s mechanismem amelogeneze a z toho vyplývajícími evolučními aspekty.

Prášková rentgenová difrakce (XRD) je efektivním nástrojem pro stanovení vlastností krystalové struktury. S vývojem nových počítačových programů pro analýzu krystalografických dat (Rodríguez-Carvajal, 1993; Larson and Von Dreele, 2000; Petříček et al., 2014) můžeme kromě informací o mřížkových parametrech, intenzitě difrakcí a jejich pozici a tvaru, pozici atomů a délkách vazeb, provést také důkladnou analýzu velikosti krystalitů a mikronapětí. Kromě toho byly do Rietveldovy a LeBailovy metody vloženy možnosti výpočtu anizotropního chování obou mikrostrukturních parametrů (Lutterotti et al., 1992; Rodríguez-Carvajal, 2001). Velikost krystalitů hydroxyapatitů ve sklovině pomocí XRD byla v minulosti stanovena mnohokrát (Jensen and Möller, 1948; Trautz et al., 1953; Grove et al., 1972), nicméně přesné určení anisotropie velikosti

---

krystalitů a mikropnutí analytickými metodami aproximace celého naměřeného záznamu doposud nebylo použito. Kromě toho, stále existují velké mezery v pochopení vlivu odontogenetických procesů na mikrostrukturní vlastnosti HAp a jak variace těchto parametrů mohou ovlivnit konečné kvality skloviny.

Cílem tohoto výzkumu je pomocí metod aproximace celého XRD záznamu charakterizovat strukturní a mikrostrukturní rysy zubního HAp, určit jejich vliv na mechanické vlastnosti skloviny, sledovat variace v chemickém/fázovém složení a diskutovat tyto aspekty v kontextu amelogeneze a evolučních trendů savců. Dále otestovat rozličné techniky přípravy vzorků pro práškovou rentgenovou difrakční analýzu a ukázat jejich vliv na mikrostrukturní vlastnosti HAp. Tento nový přístup v konečném důsledku umožní porozumět bio-mineralizačním procesům probíhajícím ve sklovině z pohledu anorganické složky. Navíc, může poskytnout vodítko pro lepší charakterizaci nově vytvořených biomimetických materiálů nejen ve smyslu makrostrukturního popisu skloviny (správného vývoje prismatických a krystalů HAp) ale také vnitřních strukturních charakteristik krystalů, které ovlivňují celkové kvalitativní vlastnosti skloviny. V neposlední řadě má tato studie potenciálně významný dopad na vnímání amelogeneze a její adaptace na funkční a potravní nároky jednotlivých zubů.



## Kapitola 2

# Materiály a Metodika

Ve všech třech projektech mé teze jsem jako zvířecí model použila miniaturní prasata z chovů Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. v Liběchově. Liběchovská miniprasata byla původně zkrížena z Hormelských a Göttingenských kanců a prasnic přivezených z Hormelského institutu univerzity v Minnesotě a Institutu po chov zvířat a genetiku univerzity v německém Göttingenu v roce 1967. V následujících letech byli přivezeni další Göttingenští kanci ke křížení, čímž bylo docíleno kontrolovaného výběru tvaru těla, zdraví zvířat, bílé barvy kůže umožňující studium kožních kmenových buněk (Motlík et al., 2007) a zvýšení průměrné velikosti vrhu (dnes okolo 6-10 selat). Jedinci dosáhnou sexuální dospělosti ve zhruba 4–5 měsících věku, kdy se jejich průměrná váha pohybuje okolo 12–15 kg. Váha dospělého jedince může dosáhnout 40–120 kg (Vodička et al., 2005; Baxa et al., 2013; Schramke et al., 2015).

Horní a spodní čelisti byly odebrány z 24 usmrcených jedinců a všech šest stoliček spodní čelisti bylo použito na experimenty. Zuby jednoho jedince jsem vyloučila z výzkumu, protože na jejich povrchu bylo příliš velké množství zubního kamene, který nešel odstranit, a také nešlo vyloučit možnou přítomnost zubního kazu. Všechny stoličky byly nejprve zdokumentovány za pomoci optického mikroskopu s digitálním fotoaparátem. Vybrané části skloviny každé stoličky byly rozčleněny na fragmenty, které byly následně rozdraceny v acetonu. Výsledný prášek byl použit při experimentech na práškovém rentgenovém difraktometru a infračerveném spektrometru. Zbytek vzorku byl zalit do epoxidové pryskyřice a jeho povrch byl naleštěn.

K určení chemického složení skloviny byla použita energiově-disperzní rentgenová spektroskopie. Vzorky byly analyzovány ve vysokém vakuu

---

při pracovní vzdálenosti 8–10 mm skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM) Tescan Vega3 XM doplněným energiově–disperzním spektrometrem Bruker Quantax 200. SEM byl v nastavení sekundárních či zpětně odražených elektronů se stejnými měřicími podmínkami také použit pro zobrazení strukturního uspořádání skloviny. Leštěné vzorky určené na chemické analýzy byly na povrchu pouhlikovány zatímco k zobrazování struktury byly nejprve analyzovány leštěné nábrusy poprášené zlatem a pak byl povrch stejných vzorků leptán 3% roztokem kyseliny solné a opět pozlacen a analyzován.

Prášková rentgenová difrakce (XRD) byla použita k charakterizaci strukturních a mikrostrukturních parametrů sklovinových HAp. Analýzy byly provedeny pomocí difraktometru Bruker D8 Discover s lineárním detektorem LynxEye a primárním germaniovým monochromátorem poskytujícím  $\text{CuK}_{\alpha 1}$  primární záření o vlnové délce 1.54056 Å. Záznamy byly pořízeny v širokém rozsahu úhlů  $2\theta$  s úzkým krokem (0.013–0.015) a načítacím časem pohybujícím se v rozsahu 5 až 7 vteřin na krok v závislosti na potřebách daného projektu. Le Bailova analýza s použitím aproximace celého záznamu a výpočty mikrostrukturních vlastností byly uskutečněny programem FullProf (Rodríguez-Carvajal, 2001).

Infračervená spektra byla sbírána v rozmezí oblasti 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  pomocí spektrometru Nicolet 6700 v transmisním uspořádání (KBr pelety) s rozlišením 2  $\text{cm}^{-1}$  a s Happ-Genzelovou apodizací. Pološířka pásů (FWHM) infračervených spekter odráží spojení efektů relativní velikosti zrn a lokálního uspořádání krystalů. Abych z dat získala pouze čistý příspěvek lokálního uspořádání krystalu, věnovala jsem velkou pozornost technice přípravy vzorků (Asscher et al., 2011; Poduska et al., 2011). Pološířka a infračervený splitting faktor nebo také index krystalinity, považovaný za přímého ukazatele lokálního uspořádání, byl vypočítán podle Weiner and Bar-Yosef (1990).

Mikromechanické vlastnosti byly stanoveny pomocí instrumentovaného mikrotvrdoměru Micro-Combi Tester, CSM Instruments. Ve vybrané části každého vzorku bylo provedeno alespoň 10 vtisků ve stejné vzdálenosti od rozhraní skloviny a zuboviny nebo povrchu zubu. Vtisky byly provedeny Vickersovým indentorem ve tvaru pyramidy (úhel mezi dvěma nesousedícími plochami je 136) se specifickými parametry měření pro každý projekt. Z křivek ukazujících vynaloženou sílu ( $F$ ) oproti hloubce vtisku ( $h$ ) byly vypočteny pomocí programu Indentation 5.18 (Oliver and Pharr, 2004) následující parametry: mikrotvrdomost ( $H_{IT}$ ), indentační modul ( $E_{IT}$ ), indentační creep ( $C_{IT}$ ) a elastická část indentační práce ( $\eta_{IT}$ ).

# Kapitola 3

## Výsledky a Diskuze

V této kapitole chci představit tři projekty, které byly součástí výzkumů souvisejících s mým doktorským studiem, a které byly publikovány nebo předloženy do mezinárodně renomovaných časopisů. Hlavní cíle, otázky a základní shrnutí výsledků mé práce jsou zdůrazněny v následujících sekcích.

### 3.1 Vliv přípravy vzorku na mikrostrukturu apatitu zubní skloviny

Studium struktury skloviny pomocí XRD a TEM metod může poskytnout nedocenitelné informace o chování HAp krystalů během odontogeneze a jejich přínosu k jedinečným kvalitativním vlastnostem dospělé skloviny. K těmto účelům bylo vytvořeno několik technik separace čisté skloviny od zuboviny. Tento krok je velmi důležitý, protože obě tkáně se vyvíjejí odlišnými procesy, které ve výsledku zajistí jejich odlišné strukturní a kvalitativní vlastnosti, spolu s odlišným chemickým složením. Doposud ale nebyla předložena systematická studie o vzniku možných artefaktů či poruch v důsledku nevhodné přípravy tkáně. V tomto projektu jsem na zkoumané vzorky aplikovala šest nejběžněji používaných technik separace skloviny (tj. dezintegrace skloviny v ručním pístovém drtiči, odvrtnání zuboviny nebo skloviny s a bez chladicího média pomocí mikrobrusky, fragmentace tepelným šokem pomocí tekutého dusíku, deproteinace v hydrazin hydrátu).

Čistá sklovina je složena výhradně z HAp s příměsí organických zbytků. Nevhodná separační technika může působit na vzorek termálním

zatížením nebo vyvolat chemickou reakci (např. s hydrazin hydrátem) a podnítit tak tvorbu dalších minerálních fází. Je ukázáno, že dokonce i při použití chladicího média k redukci tepelné námahy při odvtřívání vzorku vznikají arteficiální fáze. Kromě toho mohou být nevhodně vybranou technikou přípravy vzorku silně ovlivněny i tvar a velikost krystalitů HAp. Tyto výsledky ukazují důležitost pečlivé a odpovídající přípravy vzorků nejen pro pozdější přesnou charakterizaci mikrostrukturních vlastností krystalů, ale také pro další výzkumy zabývající se určováním fázového nebo chemického složení skloviny.

**Tato práce byla publikována jako:** Kallistová A., Skála R., Horáček I., Miyajima N. and Malíková R. (2015). Influence of Sample Preparation on the Microstructure of Tooth Enamel Apatite, *J. Appl. Cryst.* **48**, 763–768.

## 3.2 Maturace savčí skloviny: krystalografické změny předcházející prořezání zubu

V této sekci představím výsledky projektu, který detailně popisuje růst HAp krystalitů a variace v mikropnutí a mechanických vlastnostech během maturačního stádia amelogeneze. Přináším zde také nový pohled na posloupnost tvorby makrostrukturních prvků skloviny a dávám je do kontextu se savčími evolučními trendy.

Základní znalosti, které dnes máme o embryonálním vývoji zubu, byly získány převážně experimenty na lidském či hlodavčím modelu. Oba tyto řády (tedy primáti a hlodavci) patří do evolučně vysoce odvozených savčích skupin nejen z pohledu zubních makrostrukturních znaků vytvořených v souladu s funkčními nároky, ale také v dalších fylogenetických aspektech. S ohledem na předchozí studie tribosfenické stoličky (Osborn, 1907; Evans and Sanson, 2003; Špoutil et al., 2010) jsem se rozhodla studovat podobnosti a odlišnosti ve vývoji skloviny savců pomocí modelu miniaturního prasete, který je evolučně bližší tomuto ancestrálnímu typu zubu. Kromě toho, díky velké tloušťce sklovinové vrstvy prasečí stoličky, jsem byla schopna po krocích sledovat postupný vývoj amelogeneze v rámci jednoho zubu.

Dosažené výsledky naznačují, že tloušťka krystalů HAp, která doposud nebyla stanovena, je proměnlivá v závislosti na vzdálenosti od hranice zuboviny a skloviny. Tyto krystaly, pozorovatelné skenovacím elektronovým mikroskopem, jsou složené z několika krystalitů v sou-

ladu s krystalografickou notací (Klug and Alexander, 1974), které by tak měly být považovány za základní strukturní jednotky skloviny (porovnej se strukturními stupni definovanými Koenigswald and Clemens (1992)). Termíny krystal a krystalit jsou často zaměňovány. Proto bych ráda zdůraznila své přesvědčení, že krystalit je strukturní podjednotka krystalu, která se vztahuje k jeho vnitřním strukturním vlastnostem.

Laterální fúze jednotlivých HAp krystalitů byla původně představena jako proces, který je zodpovědný za rozšiřování sklovinových prismatických během embryonálního vývoje zubu a jako hlavní důvod ustavení konečné tvrdosti skloviny (Robinson et al., 1989). Systematická studie růstu krystalitů a také změn mechanických vlastností během maturačního stádia amelogeneze naznačuje, že růst krystalitů do šířky je postupný proces (tedy bez laterální fúze) a že ustálení konečných mechanických vlastností prasečí skloviny je spojeno s opožděnou tvorbou interprismatické skloviny. Právě tato časová prodleva mezi tvorbou prismatické a interprismatické části skloviny je na základě mých pozorování zásadním rozdílem mezi prasečí a evolučně výše odvozenými stupni savčí skloviny.

**Tato práce byla publikována jako:** Kallistová A., Horáček I., Šlouf M., Skála R. and Fridrichová M. (2017). Mammalian Enamel Maturation: Crystallographic Changes Prior to Tooth Eruption. *PLoS ONE*, **12**, e0171424.

### 3.3 Krystalinita skloviny: významná součást savčí zubní adaptace

Dále jsem studovala vztah mezi stupněm povrchového opotřebení zubu, délkou amelogeneze/kalcifikace a mikrostrukturními parametry HAp. V tomto projektu, je zdůrazněn vliv rozdílů ve velikosti krystalitů, mikro-napětí a krystalinity na konečné kvality skloviny.

Porovnávala jsem chemické složení, mikrostrukturní, strukturní a mechanické vlastnosti tří typů stoliček miniaturního prasete (tzn. první, druhé a třetí stoličky z jedné dentice), zubů poskytujících stejnou kousací funkci a majících rozdílnou délku embryonálního vývoje. Tento postup mi umožnil přímo určit vzájemné propojení mezi sledovanými parametry a jejich závislost na délce kalcifikačního procesu amelogeneze bez vlivu jiných zejména biologických proměnných.

V souhrnu, chemické složení a mřížkové parametry nekorelují s ostatními sledovanými kvalitativními i kvantitativními faktory. Velikost HAp

krystalitů a tuhost skloviny se postupně zvyšují s ohledem na délku kalcifikace minerální fáze během amelogeneze, oproti tomu relativní množství mřížových poruch stejně jako elastická část indentační práce vykazují výrazný pokles hodnot. Stejně korelační trendy jsem pozorovala i u jelena evropského. Toto pozorování naznačuje obecnější charakter efektů prodloužení kalcifikace a tím i její adaptační předurčení pro kvalitativní požadavky, zejména odolnost vůči otěru. Kromě toho, vnitřní struktura HAp se nemění s věkem zvířete.

**Tato práce byla předložena k publikaci jako:** Kallistová A., Skála R., Šlouf M., Čejchan P., Matulková I. and Horáček I. (2017). Enamel Crystallinity: a Significant Component of the Mammalian Dental Adaptations. Předloženo do *Scientific Reports*.

# Kapitola 4

## Závěry

Cílem této doktorské práce bylo ukázat jak krystalografická charakterizace za použití metod aproximace celého difrakčního záznamu a výzkum chemického a fázového složení savčích tvrdých tkání přispívají našemu porozumění kvalitativnímu chování anorganické součásti těla, tedy hydroxyapatitu. Kromě toho předložené výsledky dokazují, že existuje vztah mezi těmito charakteristikami, mechanismem amelogeneze a také jejich adaptačních strategií vzhledem k funkčním nárokům zubu.

Při hledání nejvhodnější techniky přípravy vzorku čisté skloviny jsem ukázala, že:

- Nevhodná technika přípravy ovlivňuje tvar krystalitu a to především ve směru (001).
- Vliv mikronapětí je nevýznamný vzhledem k tomu, že jeho absolutní hodnoty se pohybují v rozmezí vypočítaných směrodatných odchylek.
- Díky zvýšení teploty při odvrátávání nebo také díky chemické reakci s hydrazin hydrátem během deproteinace dochází ke vzniku nových fází.
- Mechanická separace je nejvhodnější metodou přípravy vzorku, neboť vede k výsledkům shodujícím se s předchozími experimentálními daty.

Studium maturační fáze amelogeneze z pohledu anorganické složky přineslo následující poznatky:

- 
- Maturace skloviny a růst krystalitů jsou postupně probíhající procesy, které začínají na rozhraní zuboviny a skloviny v místě pod budoucím hrbolekem v mesiální části zubu, a dále se šíří podél hraniční linie směrem ke kořenům, současně k povrchu a do distálních částí zubu.
  - Rychlý růst krystalitů do délky během sekrečního stádia amelogeneze je nahrazen pomalým postupným rozšiřováním krystalitů, které nenaznačuje laterální fúzi jednotlivých krystalitů.
  - Krystal HAp je agregát složený ze 2 až 3 subjednotek (tedy krystalitů).
  - Během růstu HAp dochází k relaxaci mikrostruktury - hustota mřížových poruch rychle klesá.
  - Ke krystalizaci interprismatické skloviny dochází až po vytvoření prismatické kostry, což je bráno jako apomorfní znak savčí dentice blízké ancestrálním typům skloviny (tzn. tribosfenické stoličky).
  - Charakteristické kvalitativní vlastnosti dospělé skloviny jsou ustáleny po vytvoření interprismatické části.
  - Třetí stolička miniaturního prasete dosahuje plné dospělosti okolo 26 měsíce života zvířete.

Nakonec jsem ukázala, že strukturní a mikrostrukturní charakteristiky zubního HAp hrají významnou roli při evolučních adaptacích savčích zubů. V souhrnu:

- Velikost krystalitů roste, zatímco hodnota mikronapětí klesá společně se zlepšením krystalinity HAp a mechanických vlastností skloviny s prodloužením embryonálního vývoje zubu, tzn. délka mineralizace skloviny ovlivňuje její mikrostrukturní charakteristiky, což se odráží ve výsledné kvalitě a odolnosti skloviny.
- Výše uvedené výsledky lze považovat za obecné chování procesů amelogeneze u většiny savčích druhů.



# Bibliography/Literatura

- Aoba, T., Tanabe, T., and Moreno, E. C. (1987). Function of amelogenins in porcine enamel mineralization during the secretory stage of amelogenesis. *Adv. Dent. Res.*, 1(2):252–260.
- Asscher, Y., Weiner, S., and Boaretto, E. (2011). Variations in atomic disorder in biogenic carbonate hydroxyapatite using the infrared spectrum grinding curve method. *Adv. Funct. Mater.*, 21(17):3308–3313.
- Baxa, M., Hruska-Plochan, M., Juhas, S., Vodicka, P., Pavlok, A., Juhasova, J., Miyanochara, A., Nejime, T., Klima, J., Macakova, M., et al. (2013). A transgenic minipig model of huntington’s disease. *J Huntington’s Dis*, 2(1):47–68.
- Cuisinier, F., Steuer, P., Frank, R., and Voegel, J. (1990). High resolution electron microscopy of young apatite crystals in human fetal enamel. *J. Biol. Buccale*, 18(2):149–154.
- Cuisinier, F. J. G., Steuer, P., Senger, B., Voegel, J. C., and Frank, R. M. (1993). Human amelogenesis: high resolution electron microscopy of nanometer-sized particles. *Cell Tissue Res.*, 273(1):175–182.
- Daculsi, G. and Kerebel, B. (1978). High-resolution electron microscope study of human enamel crystallites: Size, shape, and growth. *J. Ultrastruct. Res.*, 65(2):163–172.
- Davis, B. M. (2011). Evolution of the tribosphenic molar pattern in early mammals, with comments on the dual-origin hypothesis. *J. Mammal. Evol.*, 18(4):227–244.
- Elliott, J., Holcomb, D., and Young, R. (1985). Infrared determination of the degree of substitution of hydroxyl by carbonate ions in human dental enamel. *Calcif. Tissue Int.*, 37(4):372–375.

- Elliott, J. C. (1964). The crystallographic structure of dental enamel and related apatites. *PhD Thesis; Faculty of Science, University of London*, pages 1–203.
- Elliott, J. C., editor (1994). *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, volume 18. Elsevier.
- Evans, A. R. and Sanson, G. D. (2003). The tooth of perfection: functional and spatial constraints on mammalian tooth shape. *Biol. J. Linnean. Soc.*, 78(2):173–191.
- Fincham, A., Moradian-Oldak, J., and Simmer, J. (1999). The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J. Struct. Biol.*, 126(3):270–299.
- Fincham, A. G., Moradian-Oldak, J., Simmer, J. P., Sarte, P., Lau, E. C., Diekwisch, T., and Slavkin, H. C. (1994). Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structures. *J. Struct. Biol.*, 112(2):103–109.
- Ganss, B. and Abbarin, N. (2014). Maturation and beyond: proteins in the developmental continuum from enamel epithelium to junctional epithelium. *Front. Physiol.*, 5(1):371.
- Grove, C., Judd, G., and Ansell, G. (1972). Determination of hydroxyapatite crystallite size in human dental enamel by dark-field electron microscopy. *J. Dent. Res.*, 51(1):22–29.
- Holcroft, J. and Ganss, B. (2011). Identification of amelotin-and odam-interacting enamel matrix proteins using the yeast two-hybrid system. *Eur. J. Oral Sci.*, 119(s1):301–306.
- Iijima, M., Moriwaki, Y., Takagi, T., and Moradian-Oldak, J. (2001). Effects of bovine amelogenins on the crystal morphology of octacalcium phosphate in a model system of tooth enamel formation. *J. Cryst. Growth*, 222(3):615–626.
- Iwasaki, K., Bajenova, E., Somogyi-Ganss, E., Miller, M., Nguyen, V., Nourkeyhani, H., Gao, Y., Wendel, M., and Ganss, B. (2005). Amelotina novel secreted, ameloblast-specific protein. *J. Dent. Res.*, 84(12):1127–1132.
- Jensen, A. T. and Möller, A. (1948). Determination of size and shape of the apatite particles in different dental enamels and in dentin by the x-ray powder method. *J. Dent. Res.*, 27(4):524–531.

- Klug, H. and Alexander, L. (1974). *X-ray Diffraction procedures for polycrystalline and amorphous materials*, chapter Crystallite size and lattice strains from line broadening, pages 618–708. John Wiley and Sons, Inc., New York, USA, 2nd edition.
- Koenigswald, W. v. and Clemens, W. A. (1992). Levels of complexity in the microstructure of mammalian enamel and their application in studies of systematics. *Scanning Microsc.*, 6(1):195–217.
- Larson, A. C. and Von Dreele, R. B. (2000). *General Structure Analysis System (GSAS)*. LANSCE, MS-H805, Los Alamos National Laboratory Report 86–748, New Mexico.
- Lutterotti, L., Scardi, P., and Maistrelli, P. (1992). *LSI* - a computer program for simultaneous refinement of material structure and microstructure. *J. Appl. Crystallogr.*, 25(3):459–462.
- Margolis, H., Kwak, S.-Y., and Yamazaki, H. (2014). Role of mineralization inhibitors in the regulation of hard tissue biomineralization: relevance to initial enamel formation and maturation. *Front. Physiol.*, 5(339):1–9.
- Margolis, H. C., Beniash, E., and Fowler, C. E. (2006). Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J. Dent. Res.*, 85(9):775–793.
- Moradian-Oldak, J. (2012). Protein-mediated enamel mineralization. *Front. Biosci.*, 17(6):1996–2023.
- Moradian-Oldak, J., Leung, W., and Fincham, A. G. (1998). Temperature and pH-dependent supramolecular self-assembly of amelogenin molecules: a dynamic light-scattering analysis. *J. Struct. Biol.*, 122(3):320–327.
- Motlík, J., Klíma, J., Dvořánková, B., and Smetana, K. (2007). Porcine epidermal stem cells as a biomedical model for wound healing and normal/malignant epithelial cell propagation. *Theriogenology*, 67(1):105–111.
- Oliver, W. C. and Pharr, G. M. (2004). Measurement of hardness and elastic modulus by instrumented indentation: Advances in understanding and refinements to methodology. *J. Mater. Res.*, 19(01):3–20.
- Osborn, H. F. (1907). *Evolution of mammalian molar teeth*, volume 1. Macmillan, New York.

- Petříček, V., Dušek, M., and Palatinus, L. (2014). Jana2006. *Z. Kristallogr.*, 229(5):345–352.
- Poduska, K. M., Regev, L., Boaretto, E., Addadi, L., Weiner, S., Kronik, L., and Curtarolo, S. (2011). Decoupling local disorder and optical effects in infrared spectra: differentiating between calcites with different origins. *Adv. Mater.*, 23(4):550–554.
- Robinson, C. (2007). Self-oriented assembly of nano-apatite particles: a subunit mechanism for building biological mineral crystals. *J. Dent. Res.*, 86(8):677–679.
- Robinson, C., Kirkham, J., Brookes, S. J., Bonass, W. A., and Shore, R. C. (1995). The chemistry of enamel development. *Int. J. Dev. Biol.*, 39(1):145–152.
- Robinson, C., Kirkham, J., Stonehouse, N. J., and Shore, R. C. (1989). Control of crystal growth during enamel maturation. *Connect. Tissue Res.*, 22(1-4):765–771.
- Rodríguez-Carvajal, J. (1993). Recent advances in magnetic structure determination by neutron powder diffraction. *Phys. B: Condensed Matter*, 192(1-2):55–69.
- Rodríguez-Carvajal, J. (2001). Recent developments of the program fullprof. *Commission on powder diffraction, Newsletter*, 26:12–19. Commission on powder diffraction.
- Ruan, Q. and Moradian-Oldak, J. (2015). Amelogenin and enamel biomimetics. *J. Mat. Chem. B*, 3(16):3112–3129.
- Schramke, S., Schubert, R., Frank, F., Wirsig, M., Fels, M., Kemper, N., Schuldenzucker, V., and Reilmann, R. (2015). The libechov minipig as a large animal model for preclinical research in huntingtons disease—thoughts and perspectives. *Czech and Slovak Neurol. Neurosur.*, 6(1):55–60.
- Shaw, J. H. and Yen, P. K.-J. (1972). Sodium, potassium, and magnesium concentrations in the enamel and dentin of human and rhesus monkey teeth. *J. Dent. Res.*, 51(1):95–101.
- Simmer, J. P. and Fincham, A. G. (1995). Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit. Rev. Oral Biol. M.*, 6(2):84–108.

- Špoutil, F., Vlček, V., and Horáček, I. (2010). Enamel microarchitecture of a tribosphenic molar. *J. Morphol.*, 271(10):1204–1218.
- Trautz, O. R., Klein, E., Fessenden, E., and Addelston, H. K. (1953). The interpretation of the x-ray diffractograms obtained from human dental enamel. *J. Dent. Res.*, 32(3):420–431.
- Vodička, P., Smetana, K., Dvořánková, B., Emerick, T., Xu, Y. Z., Ourednik, J., Ourednik, V., and Motlík, J. (2005). The miniature pig as an animal model in biomedical research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1049(1):161–171.
- Weatherell, J. A., Deutsch, D., Robinson, C., and Hallsworth, A. S. (1975). Fluoride concentrations in developing enamel. *Nature*, 256(1):230–232.
- Weiner, S. and Bar-Yosef, O. (1990). States of preservation of bones from prehistoric sites in the near east: a survey. *J. Archaeol. Sci.*, 17(2):187–196.
- Young, R. A. (1974). Implications of atomic substitutions and other structural details in apatites. *J. Dent. Res.*, 53(2):193–203.

## List of publications/Seznam publikací

1. Lenka Varadzinová, Lenka Lisá, **Anna Kallistová**, Alexandra Kosinová, Jolana Malátková, Martin Dvořák & Miroslav Bárta (in prep.). Wall Paintings from the Southern Wing of the Brick Complex at Usli, Sudan.
2. Richard Thér, **Anna Kallistová** et al. (in prep.). Estimation of Thermal Characteristics Reflecting Dynamics of Pottery Firing Based on Products of the Firing.
3. **Anna Kallistová**, Ivan Horáček, Roman Skála, Petr Čejchan, Irena Matulková & Miroslav Šlouf (submitted). Enamel Crystallinity: a Significant Component of the Mammalian Dental Adaptations. Submitted to *Scientific Reports*.
4. **Anna Kallistová**, Ivan Horáček, Miroslav Šlouf, Roman Skála & Michaela Fridrichová (2017). Mammalian Enamel Maturation: Crystallographic Changes Prior to Tooth Eruption. *PLoS ONE*, 12, e0171424.
5. Lenka Lisá, Aleš Bajer, Jan Pacina, Jon-Paul McCool, Václav Cílek, Jan Rohovec, Šárka Matoušková, **Anna Kallistová** & Zdeněk Gottvald (2017). Prehistoric Dark Soils/Sediments of Central Sudan: Case Study from the Mesolithic Land Landscape at the Sixth Nile Cataract. *Catena*, 149, 273–282.
6. Luděk Kaluža, Mikkel J. Larsen, Ignacio J. Morales, Sara Cavaliere, Deborah J. Jones, Jacques Rozière, **Anna Kallistová**, Pavel Dytrych, Daniela Gulková & Madeleine Odgaard (2016). Synthesis of Pt/C Fuel Cell Electrocatalysts: Residual Content of Chloride and Activity in Oxygen Reduction. *Electrocatalysis*, 7(4), 269–275.
7. Jan Mrázek, Michel Potel, Jiří Buršík, Aleš Mráček, **Anna Kallistová**, Šárka Jonášová, Jan Boháček & Ivan Kašík (2015). Sol-gel Synthesis and Crystallization Kinetics of Dysprosium-Titanate Dy<sub>2</sub>Ti<sub>2</sub>O<sub>7</sub> for Photonic Applications. *Materials Chemistry and Physics*, 168, 159–167.

8. **Anna Kallistová**, Roman Skála, Ivan Horáček, Nobuyoshi Miyajima & Radana Malíková (2015). An Influence of Sample Preparation on the Micro-structure of Tooth Enamel Apatite. *Journal of Applied Crystallography*, 48, 763–768.
9. **Anna Kallistová** (2014). Mineralogy. In: Geology around us, Jakub Trubač (ed.), P3K s.r.o., 27–34.
10. Alexander R. Cabral, Roman Skála, Anna Vymazalová, **Anna Kallistová**, Bernd Lehmann, Jacques Jedwab & Tamara Sidorinová (2014). Kitagoite,  $\text{Pt}_7\text{Cu}$ , a New Mineral from the Lubero Region, North Kivu, Democratic Republic of the Congo. *Mineralogical Magazine*, 78(3), 739–745.
11. Jakub Plášil, Anatoly V. Kasatkin, Radek Škoda, Milan Novák, **Anna Kallistová**, Michal Dušek, Roman Skála, Karla Fejfarová, Jiří Čejka, Nicolas Meisser, Herman Goethals, Vladimír Machovič & Ladislav Lapčák (2013). Leydetite,  $\text{Fe}(\text{UO}_2)(\text{SO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_{11}$ , a New Uranyl Sulfate Mineral from Mas d'Alary, Lodve, France. *Mineralogical Magazine*, 77(3), 429–441.
12. Petr Ondruš, Roman Skála, Jakub Plášil, Jiří Sejkora, František Veselovský, Jiří Čejka, **Anna Kallistová**, Jan Hloušek, Karla Fejfarová, Radek Škoda, Michal Dušek, Ananda Gabašová, Vladimír Machovič & Ladislav Lapčák (2013). Švenekite,  $\text{Ca}[\text{AsO}_2(\text{OH})_2]_2$ , a new mineral from Jáchymov, Czech Republic. *Mineralogical Magazine*, 77(6), 2711–2724.

# ANNA KALLISTOVÁ

## PERSONAL INFORMATION

*Date of Birth*      October 30, 1982  
*Citizenship*      Czech Republic  
*email*              [kallistova.anna@gmail.com](mailto:kallistova.anna@gmail.com)  
*phone*              +1 (323) 202 0625

## EDUCATION AND WORK EXPERIENCE

*B. Sc. in Geology*      2004-2007      Charles University, Prague  
Faculty of Natural Sciences · Department of Geology ·  
Institute of Geochemistry, Mineology and Mineral Resources  
Thesis: *Colour changes of different genetics types of corundum after heat treatment*  
Advisor: RNDr. Irena Kolaříková, Ph. D.

*M. Sc. in Geology*      2007-2010      Charles University, Prague  
Faculty of Natural Sciences · Department of Geology ·  
Institute of Geochemistry, Mineology and Mineral Resources  
Thesis: *Crystal chemistry of pyroxenes and amphiboles from the České středohoří*  
Advisor: RNDr. Roman Skála, Ph. D.

*PhD student*              *Current status*      Charles University, Prague  
Faculty of Natural Sciences · Department of Geology ·  
Institute of Geochemistry, Mineology and Mineral Resources  
Thesis: *Structural and chemical aspects of calcium phosphate formation in tooth enamel*  
Advisor: RNDr. Roman Skála, Ph. D. & Prof. RNDr. Ivan Horáček, CSc.

*Graduate specialist*      2011-2017      Institute of Geology, Czech Academy of Sciences  
Department of Analytical Methods · Laboratory of X-ray Powder Diffraction ·  
Laboratory of Scanning Electron Microscopy

*Teaching*                  2012-2014      Charles University, Prague  
Mineralogy and Crystallography · theoretical and practical courses (assistant)  
· Faculty of Natural Sciences · Department of Geology · Institute of  
Geochemistry, Mineology and Mineral Resources

## PUBLICATIONS

*in prep.*                  WALL PAINTINGS FROM THE SOUTHERN WING OF  
THE BRICK COMPLEX AT USLI, SUDAN

*in prep.*                  Authors: Lenka Varadzinová, Lenka Lisá, **Anna Kallistová**, Alexandra  
Kosinová, Jolana Malátková, Martin Dvořák & Miroslav Bárta

*in prep.*                  ESTIMATION OF THERMAL CHARACTERISTICS  
REFLECTING DYNAMICS OF POTTERY FIRING BASED ON PRODUCTS  
OF THE FIRING

*in prep.*                  Authors: Richard Thér, **Anna Kallistová** et al.



- Scientific Reports* submitted ENAMEL CRYSTALLINITY: A SIGNIFICANT COMPONENT OF THE MAMMALIAN DENTAL ADAPTATIONS  
Authors: **Anna Kallistová**, Ivan Horáček, Roman Skála, Petr Čejchan, Irena Matulková & Miroslav Šlouf
- PLoS ONE* 2017 MAMMALIAN ENAMEL MATURATION: CRYSTALLOGRAPHIC CHANGES PRIOR TO TOOTH ERUPTION  
Authors: **Anna Kallistová**, Ivan Horáček, Miroslav Šlouf, Roman Skála & Michaela Fridrichová; Journal: PLoS ONE, 12, e0171424
- Catena* 2017 PREHISTORIC DARK SOILS/SEDIMENTS OF CENTRAL SUDAN: CASE STUDY FROM THE MESOLITHIC LAND SHAPE AT THE SIXTH NILE CATARACT  
Authors: Lenka Lisá, Aleš Bajer, Jan Pacina, Jon-Paul McCool, Václav Cílek, Jan Rohovec, Šárka Matoušková, **Anna Kallistová** & Zdeněk Gottwald; Journal: Catena, 149, 273–282
- Electrocatalysis* 2016 SYNTHESIS OF Pt/C FUEL CELL ELECTROCATALYSTS: RESIDUAL CONTENT OF CHLORIDE AND ACTIVITY IN OXYGEN REDUCTION  
Authors: Luděk Kaluža, Mikkel J. Larsen, Ignacio J. Morales, Sara Cavaliere, Deborah J. Jones, Jacques Rozière, **Anna Kallistová**, Pavel Dytrych, Daniela Gulková & Madeleine Odgaard; Journal: Electrocatalysis, 7(4), 269–275
- Materials Chemistry and Physics* 2015 SOL-GEL SYNTHESIS AND CRYSTALLIZATION KINETICS OF DYSPROSIUM-TITANATE  $Dy_2Ti_2O_7$  FOR PHOTONIC APPLICATIONS  
Authors: Jan Mrázek, Michel Potel, Jiří Buršík, Aleš Mráček, **Anna Kallistová**, Šárka Jonášová, Jan Boháček & Ivan Kašík; Journal: Materials Chemistry and Physics, 168, 159–167
- Journal of Applied Crystallography* 2015 AN INFLUENCE OF SAMPLE PREPARATION ON THE MICRO-STRUCTURE OF TOOTH ENAMEL APATITE  
Authors: **Anna Kallistová**, Roman Skála, Ivan Horáček, Nobuyoshi Miyajima & Radana Malíková; Journal: Journal of Applied Crystallography, 48, 763–768
- Geology around us* 2014 MINERALOGY  
Author: **Anna Kallistová**; Editor: Jakub Trubač; Chapter in book: Geology around us, P3K s.r.o., 27–34, ISBN 978–80–87343–44–9
- Mineralogical Magazine* 2014 KITAGOHAITE,  $Pt_7Cu$ , A NEW MINERAL FROM THE LUBERO REGION, NORTH KIVU, DEMOCRATIC REPUBLIC OF THE CONGO  
Author: Alexander R. Cabral, Roman Skála, Anna Vymazalová, **Anna Kallistová**, Bernd Lehmann, Jacques Jedwab & Tamara Sidorinová; Journal: Mineralogical Magazine, 78(3), 739–745
- Mineralogical Magazine* 2013 LEYDETTITE,  $Fe(UO_2)(SO_4)_2(H_2O)_11$ , A NEW URANYL SULFATE MINERAL FROM MAS DALARY, LODVE, FRANCE  
Author: Jakub Plášil, Anatoly V. Kasatkin, Radek Škoda, Milan Novák, **Anna Kallistová**, Michal Dušek, Roman Skála, Karla Fejfarová, Jiří Čejka, Nicolas Meisser, Herman Goethals, Vladimír Machovič & Ladislav Lapčák; Journal: Mineralogical Magazine, 77(3), 429–441

- 2013 ŠVENEKITE,  $Ca[AsO_2(OH)_2]_2$ , A NEW MINERAL FROM JÁCHYMOV, CZECH REPUBLIC
- Mineralogical Magazine* Author: Petr Ondruš, Roman Skála, Jakub Plášil, Jiří Sejkora, František Veselovský, Jiří Čejka, **Anna Kallistová**, Jan Hloušek, Karla Fejfarová, Radek Škoda, Michal Dušek, Ananda Gabašová, Vladimír Machovič & Ladislav Lapčák; Journal: *Mineralogical Magazine*, 77(6), 2711–2724

CONFERENCES AND MEETINGS

- 2016 MAMMALIAN ENAMEL MATURATION: CRYSTALLOGRAPHIC CHANGES PRIOR TO TOOTH ERUPTION
- Enamel9* Authors: **Anna Kallistová**, Ivan Horáček, Miroslav Šlouf, Roman Skála & Michaela Fridrichová  
Event: Enamel Symposium – Enamel9, Harrogate, UK  
poster and talk
- 2016 WALL PAINTINGS FROM THE SOUTHERN WING OF THE BRICK COMPLEX AT USLI, SUDAN
- 12th International Conference for Meroitic Studies* Authors: Lenka Varadinová, Lenka Lisá, **Anna Kallistová**, Alexandra Kosinová, Jolana Malátková, Martin Dvořák & Miroslav Bárta  
Event: 12th International Conference for Meroitic Studies, Prague, CR  
talk
- 2016 DUAL NATURE OF MAMMALIAN ENAMEL FORMATION
- Zoological Days* Authors: **Anna Kallistová**, Ivan Horáček  
Event: Zoological Days, České Budějovice, CR  
talk
- 2015 ENAMEL EMBRYONIC DEVELOPMENT AND ITS IMPACT ON MICROSTRUCTURE OF TOOTH HYDROXYAPATITE
- BiominXIII* Authors: **Anna Kallistová**, Ivan Horáček & Roman Skála  
Event: 13th International Symposium on Biomineralization – BiominXIII, Granada, Spain  
talk
- 2015 EMBRYONIC DEVELOPMENT OF MOLARS IN TERMS OF XRD
- Goldschmidt2015* Authors: **Anna Kallistová**, Ivan Horáček & Roman Skála  
Event: Goldschmidt2015, Prague, CR  
poster
- 2015 ENAMEL MICROSTRUCTURE AND TOOTH EMBRYONIC DEVELOPMENT
- ECM29* Authors: **Anna Kallistová**, Ivan Horáček, Petr Čejchan & Roman Skála  
Event: 29th European Crystallographic Meeting, Rovinj, Croatia  
poster
- 2014 AN INFLUENCE OF SAMPLE PREPARATION ON THE MICROSTRUCTURE OF DENTAL HYDROXYLAPATITE
- CEMC4* Authors: **Anna Kallistová**, Roman Skála, Radana Malíková & Ivan Horáček  
Event: 4th Central European Mineralogical Conference – CEMC4, Skalský Dvůr, CR  
poster

2014 THE DEPENDENCE OF HYDROXYLAPATITE  
MICROSTRUCTURE ON THE DURATION OF TOOTH DEVELOPMENT  
*Structure2014* Authors: Anna Kallistová, Ivan Horáček & Roman Skála  
Event: Colloquium organized by Czech and Slovak Crystallographic  
Association and Regional Committee of the IUCr – Structure2014, Kutná Hora,  
CR.  
talk

#### AWARDS AND HONORS

2012-2015 Grant Agency of the Charles University  
*Grant* Project leader: Anna Kallistová  
Project: Vertebrate dentition: Mineralogical and crystallographic  
characterization of inorganic component  
Grant Agency of the Charles University (GAUK) - founding for young  
researchers

2012-2013 Grant Agency of the GLU AV CR  
*Grant* Project leader: Anna Kallistová  
Project: Mammalian dentition from mineralogical and crystallographic  
perspective  
Grant Agency of the Geological Institute Academy of Science

2015 Josef, Marie and Zdena Hlávka Foundation  
*Award* Josef, Marie and Zdena Hlávka Foundation for young talented scientists,  
writers and artists · Travel award · 13th International Symposium on  
Biomaterialization (BiominXIII), Granada, Spain

2016 Enamely  
*Award* Early career researcher travel award · Enamel Symposium 2016, Harrogate,  
UK

#### SHORT COURSES

2012  
*Jana2006* The 13th Ad Hoc Workshop on Jana2006 · 3d and 4d modulated structures  
refined from powder data, powder profiles in detail (asymmetry, fundamental  
approach), application of rigid body and of local symmetry · Institute of  
Physics, Academy of Sciences, CR

2012  
*Bruker softwares* Basics in XRD Applications · qualitative and quantitative analysis of  
polycrystalline material using Diffract. Evaluation and DQuant software  
programs · Karlsruhe, Germany

2012  
*Bruker softwares* Topas Rietveld Applications and Structure Solutions Applications · profile  
analysis and Rietveld refinement by using the fundamental approach,  
theoretical fundamentals of ab-initio structure determination and refinement  
from powder diffraction data as implemented in the Diffrac. TOPAS software ·  
Karlsruhe, Germany

	2011
<i>DMG Short Course</i>	High-pressure experimental techniques · an introduction to state-of-the-art experimental methods in mineralogy, geochemistry and geophysics as applied to understanding the composition, structure and dynamics of the Earth's interior – i.e. high-pressure/high-temperature experimental methods, spectroscopy and X-ray diffraction at high-pressure, transmission electron microscopy, thermodynamics and phase equilibria, high-pressure crystal chemistry, equations of state, transformation kinetics, diffusion and deformation · ECTS certificate · Bayerisches Geoinstitut, Bayreuth, Germany
	2010
<i>Janaz006</i>	The 4th Ad Hoc Workshop on Janaz006 · solution of 3d structures, application of charge flipping to 3d and modulated structures, powder data refinement, solution of 4d structures from single crystal and powder data, twins and multiphases · Institute of Physics, Academy of Sciences, CR
	2005
<i>Gemology</i>	Gemology course II. · evaluation of diamonds (4C) · Faculty of Natural Sciences, Charles University, CR
	2005
<i>Gemology</i>	Gemology course I. · theoretical knowledge about color gemstones and use of analytical methods to determine their authenticity and origin · Faculty of Natural Sciences, Charles University, CR

#### OTHER INFORMATION

<i>Lab techniques</i>	X-ray powder diffraction · Single crystal X-ray diffraction (data processing) · Multi-anvil and diamond anvil cell experimental techniques · Optical microscopy · SEM · EDAX · EPMA · FTIR · LA-ICP-mass spectrometry · Instrumented micro/nanoindentation techniques
<i>Computer Skills</i>	Topas · Diffract. Eva · Janaz006 · FullProf · HighScore Plus · Bede ZDS · Latex · GnuPlot · ImageJ · Inkscape · GIMP · CorelDRAW
<i>Languages</i>	ENGLISH · B2 – C1 FRENCH · A2 LATIN · A1



