

Nukleotidy a bielkoviny ako ochrana DNA pred jej poškodením kvercetínom v prítomnosti Cu^{2+}

LUBICA KUBIŠOVÁ—JOZEF ŠIMÚTH

Súhrn. Nukleotidy a bielkoviny zabraňujú rozklad DNA kvercetínom v prítomnosti Cu^{2+} . Zistili sme, že v prítomnosti ATP, resp. GTP koncentrácie $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ dochádza len k čiastočnému rozkladu (10—20 %) ^{14}C -DNA *E. coli* oproti kontrole v neprítomnosti nukleotidov. Za tých istých reakčných podmienok príslušné deoxynukleotidy adenínu a guanínu majú približne rovnaký ochranný účinok na DNA ako nukleotidy.

Zistili sme, že hovädzí albumín ($62.5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$) zabraňuje takmer úplne rozkladu ^{14}C -DNA *E. coli*. Rýchlosť rozkladu v prítomnosti kvercetínu a Cu^{2+} je priamo úmerná času a teplote.

V predchádzajúcej práci sme zistili, že kvercetín v prítomnosti Cu^{2+} rozkladá DNA [1, 2]. Tento jav potvrdili aj ďalší autori [3, 4]. Všetko svedčí o tom, že ide o radikálový mechanizmus poškodenia DNA [3—5].

Mnohé experimenty potvrdzujú, že bioflavonoidy majú významnú fyziologickú funkciu nielen v rastlinách, ale aj v ľudskej výžive. Je to asi 200 derivátov flavónu, s rôznym stupňom glykozylácie a hydroxylácie [6]. Ich biologický účinok nie je ešte dostatočne objasnený. Ako antioxidanty môžu zabraňovať rôznym nežiadúcim reakciám a naopak, môžu sa na týchto reakciách zúčastňovať. Zistilo sa, že majú ochrannú funkciu proti účinku toxických polycyklických uhľovodíkov a aromatických aminov, lebo blokujú ich mutagénne účinky v baktériách [7]. Na druhej strane sa zistilo, že napr. kvercetín má mutagénnu aktivitu v bakteriálnych [8] a cicavčích [9, 10] bunkách.

V experimentoch in vitro sa vo výskume biologických účinkov flavonoidov sleduje predovšetkým ich vplyv na DNA. Pri experimentoch môžeme sledovať aj vplyv zlúčenín, ktoré môžu eliminovať poškodenie DNA spôsobené bioflavonoidmi v prítomnosti rôznych činidiel. Pre náš modelový experiment sme ako

Ing. Lubica Kubišová, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Ing. Jozef Šimúth, DrSc., Laboratórium génového inžinierstva, Chemický ústav SAV, Dúbravská cesta 9, 842 38 Bratislava.

zlúčeniny, ktoré by mohli eliminovať poškodenie DNA voľnými radikálmi generovanými v prítomnosti kvercetínu a Cu^{2+} , použili nukleotidy a albumín. Tieto zlúčeniny sme zvolili preto, že najčastejšie dochádza k poškodeniu chromozómovej DNA v čase jej génovej expzie, keď sa ale nachádza v prostredí zvýšená koncentrácia nukleotidov a rôznych bielkovín, potrebných na príslušné transkripčné reakcie. Prítomnosť týchto zlúčenín sa dá vždy predpokladať v takmer všetkých potravinách.

Materiál a metódy

Na sledovanie degradácie DNA sme použili DNA z teľacieho týmusu (calf thymus DNA, REACHIM, SNŠ) a ^{14}C -DNA z *Escherichia coli* so špecifickou aktivitou $9,1 \text{ kBq ng}^{-1}$ (CBS 144, VVVR Praha). Ako štandard molekulových hmotností slúžila DNA fagu lambda po rozštípení s Hind III (Ústav molekulárnej biológie SAV). Chemikália: kvercetín (SIGMA, USA), albumine bovine (SIGMA, USA), ATP $\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (adenozíntrifosfát), GTP (guanozíntrifosfát), ADP (adenozíndifosfát), dA (deoxyadenozín), dG (deoxyguanozín) (SERVA, SRN). $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (LACHEMA, Brno).

Reakcia DNA s kvercetínom a Cu^{2+} prebiehala vo fosfátovom tlmivom roztoku ($8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), pH 8,0. Reakčná zmes obsahovala DNA teľacieho týmusu ($0,05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) alebo ^{14}C -DNA ($1,25 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$), kvercetín ($0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a CuCl_2 ($0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Agarózová gélová elektroforéza sa uskutočnila ako je uvedené v predchádzajúcej práci [2].

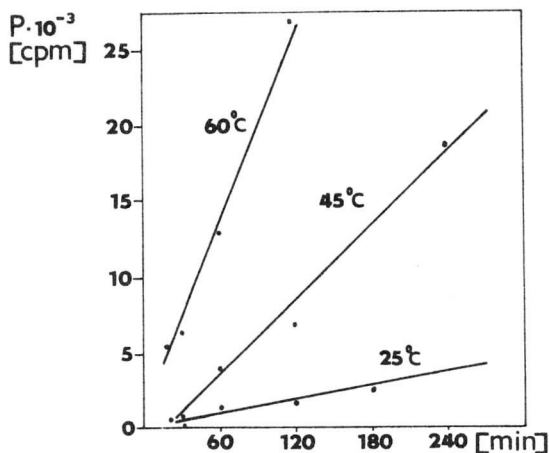
Množstvo vzniknutých degradačných produktov ^{14}C -DNA sa sledovalo metódou zostupnej papierovej chromatografie na papieri Whatman 3 v systéme octan amónny : etanol (1 : 1). V tomto systéme ostáva nedegradovaná DNA na štarte. Mierou vzniknutých degradačných produktov bola rádioaktivita papiera vo vzdialenosti 3 a viac cm od štartu.

Rádioaktivitu sme merali na scintilačnom počítači KLB WALLAC, 1217 Rackbeta v scintilačnej kvapaline obsahujúcej PPO (2,5-difeneloxazol) a 0,1 g POPOP (1,4-bis(2,5-fenyloxazolyl) benzén) v 1 l toluénu. Rádioaktivita je vyjadrená počtom impulzov za minútu (cpm), ktoré zaznamenal scintilačný prístroj. Namerané údaje boli spracované programom Grapher na osobnom počítači fy Philips.

Výsledky a diskusia

V nadväznosti na naše predchádzajúce experimenty [1, 2] o rozklade DNA teľacieho týmusu látkami propolisu rozpustnými vo vode, kvercetín v prítom-

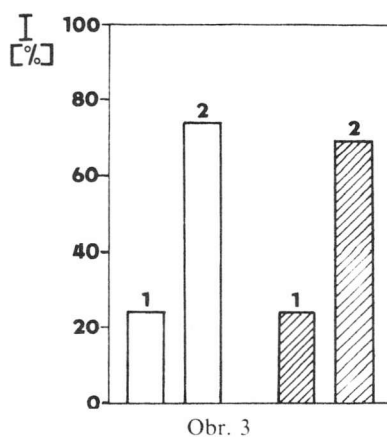
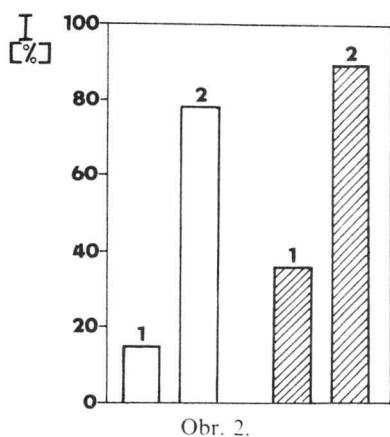
nosti Cu^{2+} rozkladá ^{14}C -DNA *E. coli*. Množstvo degradačných produktov DNA je priamo úmerné teplote a času (obr. 1). Tento modelový experiment spolu s našimi predchádzajúcimi [1, 2] nevystihujú reakčné podmienky v živých systémoch, kde tieto reakcie prebiehajú v prítomnosti bielkovín a rôznych metabolitov napr. nukleotidov.



Obr. 1. Časová závislosť rozkladu ^{14}C -DNA v prítomnosti kvercetínu a CuCl_2 . Zloženie reakčnej zmesi: ^{14}C -DNA $1,25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, kvercetín $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, CuCl_2 $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, fosfátový tlmivý roztok $8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8,0. P — množstvo degradačných produktov vyjadrené ako cpm. Namerným údajom zodpovedajú rovnice: $25^\circ\text{C} — Y = 14,89X - 22,118$, $45^\circ\text{C} — Y = 81,02X - 1140,69$, $60^\circ\text{C} — Y = 210,55X + 509,61$.

Fig. 1. Time behaviour of ^{14}C -DNA degradation in the presence of quercetine and CuCl_2 . Reaction mixture composition ^{14}C -DNA $1,25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, quercetine $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, CuCl_2 $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, phosphate buffer $8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8,0. P — Amount of degradation products expressed as cpm. To measured values, following equations correspond: $25^\circ\text{C} — Y = 19,89X - 22,118$, $45^\circ\text{C} — Y = 81,02X - 1140,69$, $60^\circ\text{C} — Y = 210,55X + 509,61$.

V ďalších experimentoch sme sledovali práve vplyv nukleotidov a ich zložiek a bielkoviny albumínu na reakciu kvercetínu s DNA v prítomnosti Cu^{2+} . Zistili sme (obr. 2), že v prítomnosti $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CuCl_2 , $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ATP, $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GTP sa ^{14}C -DNA *E. coli* rozkladá len nepatrne (10—20 %) oproti kontrole (100 %). Ochranný vplyv nukleotidov na rozklad DNA je evidentný, pretože pri koncentrácii ATP, resp. GTP o poriadok nižšej sa ^{14}C -DNA *E. coli* rozkladá na 85,2 % v prítomnosti $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ATP, resp. 64 % v prítomnosti $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ GTP oproti kontrole v neprítomnosti nukleotidov. Podobne ako nukleotidy chránia DNA pred rozkladom v prítomnosti kvercetínu a CuCl_2 aj ich deoxynukleozidy. Na obr. 3 je znázornený vplyv deoxyadenozínu, resp. deoxyguanozínu na rozklad ^{14}C -DNA *E. coli* v prítomnosti kvercetínu a Cu^{2+} . Reakčné podmienky sú totožné s experimentmi znázornenými na obr. 2, ale



Obr. 2. Vplyv nukleotidov na štiepenie ¹⁴C-DNA *E. coli* v prítomnosti kvercetínu a CuCl₂. Zloženie reakčnej zmesi: ¹⁴C-DNA 1.25 µg.ml⁻¹, kvercetín 0.1 mmol.l⁻¹, CuCl₂ 0.1 mmol.l⁻¹.

□ 1 ATP (0.1 mmol.l⁻¹), □ 2 ATP (1.0 mmol.l⁻¹), ▨ 1 GTP (0.1 mmol.l⁻¹), ▨ 2 GTP (1.0 mmol.l⁻¹).

Podmienky reakcie: 60°C, 2 h, pH 8.0.

I — stupeň inhibície vzhľadom na reakciu bez prídavku ATP, resp. GTP.

Fig. 2. Nucleotides influence on ¹⁴C-DNA *E. coli* cleavage in the presence of quercetine and CuCl₂. Reaction mixture composition: ¹⁴C-DNA 1.25 µg ml⁻¹, quercetine 0.1 mmol.l⁻¹, CuCl₂ 0.1 mmol.l⁻¹.

□ 1 ATP (0.1 mmol.l⁻¹), □ 2 ATP (1.0 mmol.l⁻¹), ▨ 1 GTP (0.1 mmol.l⁻¹), ▨ 2 GTP (1.0 mmol.l⁻¹).

Reaction conditions: 60°C, 2 h, pH 8.0.

I — inhibition stage with respect to the reaction without ATP or GTP addition.

Obr. 3. Vplyv nukleozidov na štiepenie ¹⁴C-DNA *E. coli*. I — stupeň inhibície vzhľadom na reakciu bez prídavku dA (deoxyadenozínu), resp. dG (deoxyguanozínu). Zloženie reakčnej zmesi: ¹⁴C-DNA 1.25 µg.ml⁻¹, kvercetín 0.1 mmol.l⁻¹, CuCl₂ 0.1 mmol.l⁻¹, □ 1 dA (1.0 mmol.l⁻¹), □ 2 dA (1.0 mmol.l⁻¹), ▨ 1 dG (0.1 mmol.l⁻¹), ▨ 2 dG (1.0 mmol.l⁻¹).

Podmienky reakcie: 60°C, 2 h, pH 8.0.

Fig. 3. Nucleotides influence on ¹⁴C-DNA *E. coli* cleavage. I — inhibition stage with respect to the reaction without dA (deoxyadenosine), dG (deoxyguanosine), respectively. Reaction mixture composition: ¹⁴C-DNA 1.25 µg ml⁻¹, quercetine 0.1 mmol.l⁻¹, CuCl₂ 0.1 mmol.l⁻¹, □ 1 dA (1.0 mmol.l⁻¹), □ 2 dA (1.0 mmol.l⁻¹), ▨ 1 dG (0.1 mmol.l⁻¹), ▨ 2 dG (1.0 mmol.l⁻¹).

Reaction conditions: 60°C, 2 h, pH 8.0.

ochranný účinok deoxynukleozidov na rozklad DNA je o niečo nižší ako v prítomnosti nukleotidov.

Ďalej sme pomocou agarózovej gélovej elektroforézy sledovali účinok ATP na rozklad DNA tefacieho týmsu kvercetínom (0.1 mmol.l⁻¹) v prítomnosti CuCl₂ (0.1 mmol.l⁻¹). Pri koncentrácii 1 mmol.l⁻¹ ATP nedochádza k rozkladu tejto chromozómovej DNA (obr. 4).

Na vysvetlenie príčin inhibičného účinku nukleotidov a nukleozidov na reakciu kvercetínu s DNA v prítomnosti Cu^{2+} existuje viacero interpretácií. Nukleotidy môžu byť terčom pôsobenia vzniknutých voľných radikálov, alebo s niektorou zložkou reakcie (alebo viacerými) môžu vytvárať komplex [12], ktorý neprodukuje radikály. Ďalšou alternatívou by bolo ovplyvnenie reaktivity určitej zložky reakcie. Monoméry nukleových kyselín môžu totiž usmerňovať oxidáciu aromatických reduktónov [13].

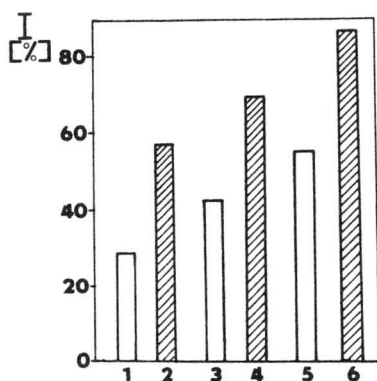


Obr. 4. Vplyv koncentrácie ATP na štiepenie DNA teľacieho týmusu pôsobením kvercetínu a CuCl_2 . Podmienky reakcie: (gélová elektroforéza) fosfátový tlmivý roztok $8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8.0 pri 25°C , 22 h. Vzorka 1 je kontrolná — čistá DNA. V ostatných vzorkách DNA ($0.05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) inkubovaná s kvercetínom ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a CuCl_2 ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Koncentrácia ATP v jednotlivých vzorkách: (1, 2) $0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (3) $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (4) $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (5) $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (6) $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (7) $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (8) $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (9) $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (10) $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (11) $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (12) $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vzorka 13 je DNA fägu lambda ($0.01 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) štiepená s Hind III.

Fig. 4. ATP concentration influence on veal thymus DNA cleavage applying quercetine and CuCl_2 . Reaction conditions: phosphate buffer $8 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH 8.0 at 25°C , 22 h. Sample No. 1 is control one — pure DNA. In other samples — DNA ($0.05 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) is incubated by means of quercetine ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) and CuCl_2 ($0.1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). ATP concentrations in individual samples: (1, 2) $0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (3) $0.01 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (4) $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (5) $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (6) $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (7) $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (8) $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (9) $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (10) $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (11) $2.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, (12) $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Sample No. 13 — DNA phage lambda ($0.01 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) cleaved by Hind III.

Okrem monomérov nukleotidov a ich deoxynukleozidov sme sledovali aj účinok hovädzieho albumínu na poškodenie DNA v prítomnosti kvercetínu a Cu^{2+} . Zistili sme (obr. 5), že albumín pri koncentrácii $62.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ takmer úplne zabráňuje vzniku degradačných produktov ^{14}C -DNA *E. coli*.

Pridaním albumínu do reakčnej zmesi došlo pravdepodobne k vytvoreniu komplexu Cu^{2+} -albumín, pretože proteíny reagujú s rôznymi kovmi za vzniku koordinačných zlúčenín [14]. Meď viazaná do komplexu sa nemôže zúčastňovať na oxidácii kvercetínu a produkcii voľných radikálov. Albumín ju takto vlastne maskuje, čo vedie k zastaveniu rozkladu DNA. Stupeň inhibície vzrastá aj s reakčnou teplotou. Pri 60°C sa na vychytávaní Cu^{2+} iónov (obr. 5) zúčastňujú pravdepodobne už aj agregáty albumínu vzniknuté denaturáciou.



Obr. 5. Vplyv albumínu na štiepenie ^{14}C -DNA. I — stupeň inhibície vzhľadom na reakciu bez prídavku albumínu. $1,25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ^{14}C -DNA štiepená kvercetínom ($0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

□ $6,25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ albumínu, ▨ $62,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ albumínu.

Podmienky reakcie: fosfátový tlmivý roztok pH 8,0.

1,2 — 24 h, 25°C , 3,4 — 24 h, 37°C , 5,6 — 2 h, 60°C .

Fig. 5. Influence of albumine on ^{14}C -DNA cleavage. I — Inhibition stage with respect to the reaction without albumine addition. $1,25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ^{14}C -DNA cleaved with quercetine ($0,1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

□ $6,25 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ albumine, ▨ $62,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ albumine.

Reaction conditions: phosphate buffer pH 8,0.

1,2 — 24 h, 25°C , 3,4 — 24 h, 37°C , 5,6 — 2 h, 60°C .

Systém kvercetín— Cu^{2+} produkujúci voľné radikály, tak ako aj ostatné oxidačno-redukčné systémy, veľmi závisí od reakčných podmienok (pH, koncentrácia reaktantov, teplota, prítomnosť iných zložiek v systéme). Za istých podmienok tento systém prejavuje schopnosť degradovať DNA. Problém vzniku voľných radikálov môže byť veľmi aktuálny v potravinárskych technológiách. Pridávanie rôznych látok, resp. využívanie rôznych procesov (sterilizácia, údenie, žiarenie) za účelom konzervácie potravín, môže ovplyvňovať látky schopné produkovať voľné radikály a tým podmieňovať tvorbu týchto radikálov. Kvalita potravín by sa preto azda mala posudzovať aj z hľadiska prítomnosti možných induktorov radikálových reakcií, ale aj látok schopných zabrániť týmto reakciám, čo potvrdili aj naše experimenty.

Literatúra

1. ŠIMÚTH, J., Molecular biology approach to the study of propolis. In: Medicines of Plant Origin in Modern Therapy Hubík, J. Novotný, L. (eds). Proceedings of the Satellite Symposium of the 4th World Conference on Clinical Pharmacology in Therapeutics. Videopress, Prague and Sumura Co. Tokyo, 1990, s. 117—120.
2. ŠIMÚTH, J., Bull. Potravn. Výsk., 30, 1991, s. 335.
3. SHIRAHATA, S.—MURAKAMI, H.—NIOKIYAMA, K.—YAMADA, K.—NONAKA, G.—NISHIOKA, K.—OMURA, H., Agric. Food Chem., 37, 1989, s. 299.
4. RAHMAN, A.—SHAHABUDDIN-HADI, S. M.—PARISH, J. H.—AINLEY, K., Carcinogenesis, 10, 1989, s. 1833.
5. FAZAL, F.—RAHMAN, A.—GREENSILL, J.—AINLEY, K.—HADI, S. M.—PARISH, J. H., Carcinogenesis, 11, 1990, s. 2005.
6. HARTMAN, P. E.—SHANKEL, D. M., Environ. Molec. Mutag., 15, 1990, s. 145.
7. NAGABHUSHAN, M.—BHIDE, S. V., Mutagenesis, 3, 1988, s. 293.
8. SUGIMURA, T.—NAGAO, M.—MATSUSHIMA, T.—YAHAGI, T.—SEINE, Y.—SHIRAI, A.—SAWAMURA, M.—NATORI, S.—YOSHIHIRA, K.—FUKUOKA, M.—KURO-YANAGI M., Proc. Jpn. Acad., B, 53, 1977, s. 194.
9. NAKAYASU, M.—SAKAMOTO, H.—TERADA, M.—NAGAO, M.—SUGIMURA, T., Mutat. Res., 162, 1986, s. 233.
10. MAC GREGOR, J. T.—WILSON, R. E., Environ. Molec. Mutag., 11, 1988, s. 315.
11. MICHALČÁKOVÁ, S.—ŠTURDÍK, E.—ŠUBÍK, J.: Laboratórium odboru I. Genetika mikro-organizmov a základy génových manipulácií. Bratislava, SVŠT 1989.
12. TADOLINI, B.—SECHI, M., Free Rad. Res. Commun., 4, 1987, s. 161.
13. SHIRAHATA, S., Nippon. Nogeihagaku Kaishi, 56, 1982, s. 1027.
14. DAVÍDEK, J.—JANIČEK, G.—POKORNÝ, J.: Chemie potravin. Praha, SNTL/Alfa 1983.

Do redakcie došlo 25. 10. 1991

Nucleotides and proteins as DNA protection before its damage by quercetine in the presence of Cu^{2+}

Summary

Nucleotides and proteins prevent DNA disintegration by quercetine in the presence of Cu^{2+} . We have found out, that in the presence of ATP or GTP as the case may be, and at the concentration level of 1.0 mmol l^{-1} , only partial disintegration of (10—20%) ^{14}C -DNA *E. coli* appears, compared with the control in the absence of nucleotides. Under the same reaction conditions, corresponding adenine and guanine nucleotides have approximately the same protective effect on DNA as nucleotides do.

We have found out, that beef albumine (62.5 ng ml^{-1}) prevents almost entirely ^{14}C -DNA *E. coli* disintegration. Degradation rate in the presence of quercetine and Cu^{2+} is directly proportional to time and temperature.

Нуклеотиды и белки как защита ДНК перед повреждением кверцетином в присутствии Cu^{2+}

Резюме

Нуклеотиды и белки препятствуют разложению ДНК кверцетином в присутствии Cu^{2+} . Мы определили, что в присутствии АТР и СТР с концентрацией 1.0 ммол. л^{-1} приходит только к частичному разложению (10—20 %) ^{14}C -ДНК Э. *coli*, против контрольной пробы без присутствия нуклеотидов. При тех-же условиях реакции, соответствующие деоксинуклеотиды аденина и гуанина, имеют приблизительно одинаковое защитное действие на ДНК как и нуклеотиды.

Мы определили, что говяжий альбумин (62.5 нг мл^{-1}) воспрепятствует почти полностью разложению ^{14}C -ДНК Э. *coli*. Скорость разложения в присутствии кверцетина и Cu^{2+} прямо пропорциональна времени и температуре.