

DOI: 10.26693/jmbs04.04.032  
УДК 576.367:576.385.7.017.68

Ткаченко А. С., Онищенко А. И., Гопкалов В. Г.,  
Горбач Т. В., Харченко Э. А., Склярук Д. О.

## ПРИМЕНЕНИЕ ВЕСТЕРН-БЛОТТИНГА И МЕТОДА ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ИНТЕНСИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ НЕКРОПТОЗА КЛЕТОК (ОБЗОР)

Харьковский национальный медицинский университет, Украина

antontkachenko555@gmail.com

В обзорной статье описаны современные методы оценки интенсивности процессов некроптоза клеток, который представляет собой альтернативный вид клеточной смерти, имеющий общие черты как с апоптозом, так и с некрозом. Некроптоз является запрограммированной гибелью клетки, сопровождающейся повреждением мембран и выходом содержимого цитоплазмы во внеклеточное пространство, что обуславливает его провоспалительный характер. В статье описаны триггеры некроптоза, молекулярные механизмы данного вида клеточной смерти, его роль в патогенезе воспалительных заболеваний, а также рассмотрены современные методы, использующиеся для оценки интенсивности процесса некроптоза клеток. На данном этапе интенсивность некроптоза оценивают преимущественно с помощью вестерн-блоттинга и метода проточной цитометрии. Первый подход базируется на идентификации фосфорилированных некроптоз-специфических белков: взаимодействующие с рецептором серин-треониновые протеинкиназы 1 и 3 (RIPK1 и RIPK3), а также псевдокиназа MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein). Вышеуказанные ферменты играют ведущую роль в реализации некроптоза, что и обуславливает их использование в методах оценки интенсивности данного вида клеточной смерти. Для детекции некроптоза методом проточной цитометрии применяются аннексин V / пропидий йодид в сочетании с микроскопией и одновременное окрашивание клеток с использованием антител к RIPK3 и каспазе-3. RIPK3 активируется только при некроптозе, а каспаза-3 является эффектором апоптоза и не вовлечена в реализацию некроптоза. Следовательно, некроптотические клетки RIPK3-позитивны и каспаза-3-негативны. Ключевым преимуществом проточной цитометрии в сравнении с вестерн-блоттингом является возможность оценки активности процессов некроптоза в отдельных субпопуляциях клеток. Мы считаем, что разработка новых

методов оценки активности некроптоза клеток *in vivo* и *in vitro* и усовершенствование уже имеющихся подходов может улучшить понимание роли данного провоспалительного вида клеточной смерти в патогенезе различных заболеваний.

**Ключевые слова:** некроптоз, клеточная смерть, некроз, апоптоз, каспазы, диагностика, вестерн-блоттинг, проточная цитометрия.

**Введение.** Смерть клеток наблюдается у всех многоклеточных живых организмов и является обязательным условием обеспечения их жизнедеятельности. Под данным термином подразумевается прекращение нормального клеточного метаболизма, исчезновение жизненно важных клеточных функций (особенно генерации АТФ и сохранение окислительно-восстановительного гомеостаза), приводящее к потере целостности клеток (проницаемость цитоплазматической мембраны или фрагментация клеток) [6, 15]. В соответствии с традиционными представлениями, выделяют запрограммированную клеточную смерть – апоптоз, и незапрограммированную – некроз. Апоптотический механизм гибели клеток опосредован протеолитическими ферментами каспазами и наблюдается при физиологических условиях, в то время как некроз рассматривается как нерегулируемая деструкция клеток с выходом их содержимого во внеклеточную среду, что носит ярко выраженный провоспалительный характер [13, 24]. Однако недавние открытия новых видов клеточной смерти бросили вызов классической концепции некроза и апоптоза. Одним из таких недавно описанных видов клеточной смерти является некроптоз, для которого характерны черты как некроза, так и апоптоза. Некроптоз, как и апоптоз, является регулируемой формой гибели клеток, однако морфологически напоминает некроз [5]. Молекулярные механизмы некроптоза, его триггеры, а также роль данного вида клеточной смерти в патогенезе

воспалительных заболеваний только изучаются, что обуславливает актуальность разработки новых методов, позволяющих изучать процесс некроптоза.

**Целью** данной работы было охарактеризовать и сравнить эффективность вестерн-блоттинга и метода проточной цитометрии, которые применяются для оценки интенсивности процессов некроптоза.

#### **Молекулярные механизмы и триггеры некроптоза**

В настоящее время известно, что ключевую роль в реализации некроптоза играет активация взаимодействующей с рецептором серин-треониновой протеинкиназы 3 (RIPK3) и псевдокиназы MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein) [14]. RIPK3 участвует в формировании некрсомы, необходимой для некроптотической гибели клеток, тогда как MLKL фосфорилируется под действием RIPK3 и транслоцируется в клеточную мембрану [8, 14]. Таким образом, активация MLKL с помощью RIPK3 необходима для разрыва мембраны, наблюдаемого во время некроптоза [8]. MLKL-опосредованный разрыв мембраны при некроптозе сопровождается выходом внутриклеточных ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMPs), которые запускают воспаление [21].

Описаны многочисленные триггеры некроптоза. В частности, инициация некроптоза опосредуется иммунными лигандами, включая FasL, ФНО, TRAIL и бактериальными липополисахаридами. Стимуляция вышеуказанными лигандами приводит к активации RIPK3 и последующему фосфорилированию MLKL [4]. Взаимодействие интерферона I типа с рецептором IFNR также приводит к каспаза-независимому RIPK3-опосредованному формированию некрсомы с развитием некроптоза [7].

Интересно также отметить, что некроптоз становится вторым по значимости видом клеточной смерти при вирусной инфекции при условии, что вирусы ингибируют апоптоз, направленный на снижение репликации.

Внутренний путь активации некроптоза обусловлен накоплением свободных радикалов и генерацией избыточного количества активных форм кислорода (АФК) [4, 22].

Несмотря на многочисленность и разнообразие триггеров некроптоза, ФНО- $\alpha$  является наиболее изученным и, вероятно, наиболее важным индуктором некроптоза при различных патологических процессах [17]. Интересно отметить, что взаимодействие ФНО- $\alpha$  с рецептором (TNFR) может приводить к индукции как апоптоза по внешнему пути, так и некроптоза. Решающую роль в определении типа клеточной смерти играет взаимодейст-

вующая с рецептором серин-треониновая протеинкиназа 1 (RIPK1). Активированная RIPK1 киназа взаимодействует с FADD и каспазой-8 с образованием комплекса, который опосредует RIPK1-зависимый апоптоз [17]. Таким образом, при активной каспазе-8 RIPK1 способствует апоптотической гибели клетки. Если каспаза-8 ингибирована, RIPK1 взаимодействует с RIPK3, что приводит к фосфорилированию и активации MLKL, опосредуя некроптоз [4], т.е. RIPK1 может рассматриваться в качестве «хаба» внутриклеточных сигнальных путей, определяя ответ на различные стимулы и последующую судьбу клетки [19]. Схожим «переключателем» в системе апоптоз/некроптоз является каспаза-8. Каспаза-8 вовлечена в апоптотическую гибель клетки, опосредуя активацию эффекторных протеолитических ферментов каспазы-3 и каспазы-7, в то же время активация каспазы-8 ингибирует RIPK1 / RIPK3-опосредованный некроптоз [20]. Стоит подчеркнуть, что когда каспазы либо ингибированы, либо не могут быть активированы, клетка не подвергается апоптозу и для обеспечения гибели клетки в подобных условиях активируется каспаза-независимый путь – некроптоз [12].

Таким образом, ключевыми условиями для некроптотической гибели клетки является экспрессия киназы RIPK3 на фоне ингибирования каспазы-8 [4].

#### **Роль некроптоза в патогенезе воспалительных заболеваний**

На сегодняшний день провоспалительный характер некроптотической гибели клеток подтвержден многочисленными исследованиями. Известно, что нарушение целостности мембраны клеток, подвергающихся некроптозу, сопровождается выделением во внеклеточную среду группы соединений (DAMPs) с ярко выраженными иммуногенными свойствами. К DAMPs относятся ИЛ-33, семейство низкомолекулярных белков S100, негистоновый ядерный белок-алармин HMGB1, молекулы АТФ, митохондриальная ДНК и другие внутриклеточные вещества [1]. DAMPs взаимодействуют с рецепторами, локализованными на поверхности клеток иммунной системы, что приводит к активации последних и секреции провоспалительных цитокинов и хемокинов. В частности, показано, что DAMPs из некроптотических клеток стимулирует секрецию CXCL1, CXCL2, ИЛ-1 и ИЛ-6, что и обуславливает провоспалительный характер некроптоза [23]. Интересно отметить, что провоспалительные эффекты не ограничиваются DAMPs-опосредованной секрецией провоспалительных цитокинов. Установлено, что в некроптотических клетках повышена экспрессия ФНО $\alpha$ -ассоциированных генов, что может свидетельствовать об активации ФНО $\alpha$ -опосредованного воспаления при некроптозе [25].

Таким образом, некроптоз клеток стимулирует воспаление несколькими путями, что обуславливает интерес к разработке методов определения его интенсивности с целью изучения роли некроптоза в патогенезе воспалительных заболеваний.

#### **Использование вестерн-блоттинга для оценки некроптоза**

Метод вестерн-блоттинга позволяет выделить и идентифицировать определенные белки из смеси различных белков с использованием специфических антител для визуализации [10]. Для оценки интенсивности процессов некроптоза метод вестерн-блоттинга применяется с целью определения некроптоз-ассоциированных белков и является на данный момент основной техникой, применяемой для идентификации некроптоза. В частности, киназа RIPK1, фосфорилированная по остатку серина в 166 позиции, киназа RIPK3, фосфорилированная по остатку серина в 232 положении, псевдокиназа MLKL, фосфорилированная по остатку треонина в 357 позиции и по остатку серина в 358 положении, используются в качестве маркеров некроптоза [2, 11, 18]. При фосфорилировании RIPK1, RIPK3 и MLKL активируются, что и наблюдается при некроптозе. Таким образом, определение фосфорилированных форм вышеуказанных некроптоз-ассоциированных киназ методом вестерн-блоттинга является надежным маркером активации некроптоза.

Одним из недавно описанных методов детекции некроптоза клеток с помощью вестерн-блоттинга является определение олигомеризации MLKL, которая происходит вследствие фосфорилирования данного белка киназой RIPK3 [3].

Стоит отметить, что данный метод не является идеальным и имеет некоторые недостатки. В частности, существенной проблемой при использовании вестерн-блоттинга для оценки некроптоза является тот факт, что все клетки в образце (живые, погибшие или погибающие клетки) анализируются как единая популяция [9]. Подобный недостаток возможно устранить при использовании метода проточной цитометрии.

#### **Использование метода проточной цитометрии для анализа интенсивности некроптоза клеток**

Проточная цитометрия активно используется для оценки интенсивности процессов апоптоза на протяжении нескольких десятилетий и имеет ряд существенных достоинств. В частности, проточная цитометрия позволяет оценивать экспрессию маркеров различных видов клеточной смерти в отдельных субпопуляциях клеток, что невозможно при использовании вестерн-блоттинга [9].

Важным фактором при исследовании некроптоза является необходимость отличить данный вид клеточной смерти от апоптоза и вторичного некроза, что может быть осуществлено при помощи метода проточной цитометрии.

Исторически первый подход к изучению некроптоза методом проточной цитометрии базировался на использовании классического маркера аннексина V и пропидия йодида в комбинации с микроскопией (imaging flow cytometry) [16]. Таким образом, появляется возможность оценить транслокацию фосфатидилсерина во внешний слой мембраны (маркер раннего апоптоза) и целостность мембраны (нарушается при позднем апоптозе, некрозе и некроптозе) с помощью аннексина V и пропидия йодида с последующим микроскопическим изучением морфологии ядра, что позволяет отличить поздний апоптоз / вторичный некроз от некроптоза.

Lee HL et al разработали способ идентификации клеток, подвергшихся некроптозу, методом проточной цитометрии с использованием антител к RIPK3 и активной каспазе-3 [9]. Киназа RIPK3 активна только при некроптозе, в то время как каспаза-3 вовлечена в апоптоз и не активируется при некроптозе. Таким образом, апоптотические клетки RIPK3-негативны и каспаза-3-позитивны, а клетки, подвергшиеся некроптозу, характеризуются RIPK3-позитивным, каспаза-3-негативным фенотипом [9].

Оба метода активно применяются для исследования процессов некроптоза на современном этапе.

#### **Заключение**

1. Одними из основных методов оценки интенсивности процессов некроптоза клеток являются вестерн-блоттинг и проточная цитометрия.
2. Детекция некроптоза методом вестерн-блоттинга базируется на определении активных фосфорилированных форм некроптоз-ассоциированных киназ RIPK3, RIPK1 и псевдокиназы MLKL.
3. Проточная цитометрия использует несколько подходов к детекции некроптотических клеток: аннексин V / пропидий йодид в сочетании с микроскопией и одновременное окрашивание клеток с использованием антител к RIPK3 и каспазе-3.
4. Основным преимуществом проточной цитометрии, по сравнению с вестерн-блоттингом, является возможность детекции некроптоза в отдельных клеточных субпопуляциях.

#### **Перспективы дальнейших исследований.**

Разработка новых методов определения интенсивности некроптоза клеток *in vivo* и *in vitro* может внести вклад в выяснении роли данного провоспалительного вида клеточной смерти в патогенезе различных заболеваний.

## References

1. Aaes TL, Kaczmarek A, Delvaeye T, De Craene B, De Koker S, Heyndrickx L, et al. Vaccination with necroptotic cancer cells induces efficient anti-tumor immunity. *Cell Rep.* 2016; 15(2): 274-87. PMID: 27050509. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.037
2. Bagnjuk K, Stöckl JB, Fröhlich T, Arnold GJ, Behr R, Berg U, et al. Necroptosis in primate luteolysis: a role for ceramide. *Cell Death Discov.* 2019; 5: 67. PMID: 30774995. PMCID: PMC6370808. doi: 10.1038/s41420-019-0149-7
3. Cai Z, Liu ZG. Detection of MLKL Oligomerization During Programmed Necrosis. *Methods Mol Biol.* 2018; 1857: 85-92. PMID: 30136232. doi: 10.1007/978-1-4939-8754-2\_8
4. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *Journal of Neuroinflammation.* 2018; 15: 199. PMID: 29980212. PMCID: PMC6035417. doi: 10.1186/s12974-018-1235-0
5. Galluzzi L, Kepp O, Chan FK, Kroemer G. Necroptosis: Mechanisms and relevance to disease. *Annu Rev Pathol.* 2016; 12: 103-30. PMID: 27959630. PMCID: PMC5786374. DOI: 10.1146/annurev-pathol-052016-100247
6. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death Differ.* 2018; 25(3): 486-541. PMID: 29362479. PMCID: PMC5864239. DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
7. Hanson B. Necroptosis: A new way of dying? *Cancer Biol Ther.* 2016; 17(9): 899-910. PMID: 27434654. PMCID: PMC5036404. DOI: 10.1080/15384047.2016.1210732
8. Huang D, Zheng X, Wang ZA, Chen X, He WT, Zhang Y, et al. The MLKL Channel in necroptosis is an octamer formed by tetramers in a dyadic process. *Mol Cell Biol.* 2017; 37(5): e00497-16. PMID: 27920255. PMCID: PMC5311246. doi: 10.1128/MCB.00497-16
9. Lee HL, Pike R, Chong MHA, Vossenkamper A, Warnes G. Simultaneous flow cytometric immunophenotyping of necroptosis, apoptosis and RIP1-dependent apoptosis. *Methods.* 2018; 134-135: 56-66. PMID: 29175336. doi: 10.1016/j.jymeth.2017.10.013
10. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci.* 2012; 4(9): 429-34. PMID: 23050259. PMCID: PMC3456489. DOI: 10.4103/1947-2714.100998
11. Meng H, Liu Z, Li X, Wang H, Jin T, Wu G, et al. Death-domain dimerization-mediated activation of RIPK1 controls necroptosis and RIPK1-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018; 115(9): E2001-E2009. PMID: 29440439. PMCID: PMC5834731. doi: 10.1073/pnas.1722013115
12. Mihaly SR, Sakamachi Y, Ninomiya-Tsuji J, Morioka S. Noncanonical cell death program independent of caspase activation cascade and necroptotic modules is elicited by loss of TGF $\beta$ -activated kinase 1. *Scientific Reports.* 2017; 7: 2918. PMID: 28592892. PMCID: PMC5462742. doi: 10.1038/s41598-017-03112-1
13. Nagata S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells. *Annu Rev Immunol.* 2018; 36: 489-517. PMID: 29400998. doi: 10.1146/annurev-immunol-042617-053010
14. Negroni A, Colantoni E, Pierdomenico M, Palone F, Costanzo M, Oliva S, et al. RIP3 and pMLKL promote necroptosis-induced inflammation and alter membrane permeability in intestinal epithelial cells. *Dig Liver Dis.* 2017; 49(11): 1201-10. PMID: 28844856. doi: 10.1016/j.dld.2017.08.017
15. Pandey SS, Singh S, Pathak C, Tiwari BS. Programmed cell death: a process of death for survival - how far terminology pertinent for cell death in unicellular organisms. *J Cell Death.* 2018; 11: 1179066018790259. PMID: 30116103. PMCID: PMC6088462. doi: 10.1177/1179066018790259
16. Pietkiewicz S, Schmidt JH, Lavrik IN. Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V / propidium iodide staining. *J Immunol Methods.* 2015; 423: 99-103. PMID: 25975759. doi: 10.1016/j.jim.2015.04.025
17. Shan B, Pan H, Najafov A, Yuan J. Necroptosis in development and diseases. *Genes Dev.* 2018; 32(5-6): 327-40. PMID: 29593066. PMCID: PMC5900707. DOI: 10.1101/gad.312561.118
18. Sureshbabu A, Patino E, Ma KC, Laursen K, Finkelsztein EJ, Akchurin O, et al. RIPK3 promotes sepsis-induced acute kidney injury via mitochondrial dysfunction. *JCI Insight.* 2018; 3(11): 98411. PMID: 29875323. PMCID: PMC6124406. doi: 10.1172/jci.insight.98411
19. Weinlich R, Oberst A, Beere HM, Green DR. Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017; 18: 127-36. PMID: 27999438. DOI: 10.1038/nrm.2016.149
20. Yuan J, Najafov A, Py BF. Roles of caspases in necrotic cell death. *Cell.* 2016; 167(7): 1693-704. PMID: 27984721. PMCID: PMC5381727. DOI: 10.1016/j.cell.2016.11.047
21. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. *Cell Res.* 2017; 28(1): 9-21. PMID: 29076500. PMCID: PMC5752838. DOI: 10.1038/cr.2017.133
22. Zhang Y, Su SS, Zhao S, Yang Z, Zhong CQ, Chen X, et al. RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. *Nat Commun.* 2017; 8: 14329. PMID: 28176780. PMCID: PMC5309790. doi: 10.1038/ncomms14329
23. Zhao H, Jaffer T, Eguchi S, Wang Z, Linkermann A, Ma D. Role of necroptosis in the pathogenesis of solid organ injury. *Cell Death Dis.* 2015; 6(11): e1975. PMID: 26583318. PMCID: PMC4670925. doi: 10.1038/cddis.2015.316

24. Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol.* 2014; 35: 14-23. PMID: 25087983. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.07.013
25. Zhu K, Liang W, Ma Z, Xu D, Cao S, Lu X, et al. Necroptosis promotes cell-autonomous activation of proinflammatory cytokine gene expression. *Cell Death Dis.* 2018; 9(5): 500. PMID: 29703889. PMCID: PMC5923285. doi: 10.1038/s41419-018-0524-y

УДК 576.367:576.385.7.017.68

**ВИКОРИСТАННЯ ВЕСТЕРН-БЛОТУ ТА МЕТОДУ  
ПРОТОЧНОЇ ЦИТОМЕТРІЇ ДЛЯ ОЦІНКИ ІНТЕНСИВНОСТІ  
ПРОЦЕСІВ НЕКРОПТОЗА КЛІТИН  
(ОГЛЯД)**

**Ткаченко А. С., Оніщенко А. І., Гопкалов В. Г., Горбач Т. В.,  
Харченко Е. О., Склярук Д. О**

**Резюме.** У оглядовій статті описані сучасні методи оцінки інтенсивності процесів некроптоза клітин, який являє собою альтернативний вид клітинної смерті, що має спільні риси як з апоптозом, так і з некрозом. Некроптоз є запрограмованою загибеллю клітини з пошкодженням мембран та виходом вмісту цитоплазми у позаклітинний простір, що зумовлює його прозапальний характер. У статті описані тригери некроптоза, молекулярні механізми даного виду клітинної смерті, його роль в патогенезі запальних захворювань, а також розглянуті сучасні методи, що використовуються для оцінки інтенсивності процесу некроптоза клітин. На даному етапі інтенсивність некроптоза оцінюють переважно за допомогою вестерн-блота й методу проточної цитометрії. Перший підхід базується на ідентифікації фосфорильованих некроптоз-специфічних білків: серин-треонінових протеїнкіназ 1 і 3, що взаємодіють з рецептором, (RIPK1 і RIPK3), а також псевдокінази MLKL (mixed lineage kinase domain-like protein). Вищевказані ферменти відіграють провідну роль в реалізації некроптоза, що й обумовлює їх використання в методах оцінки інтенсивності даного виду клітинної смерті. Для детекції некроптоза методом проточної цитометрії застосовуються анексин V / пропідій йодид в поєднанні з мікроскопією і одночасне фарбування клітин з використанням антитіл до RIPK3 і каспази-3. RIPK3 активується тільки при некроптозі, а каспаза-3 є ефектором апоптозу і не залучена у реалізацію некроптозу. Отже, некроптичні клітини RIPK3-позитивні та каспаза-3-негативні. Ключовою перевагою проточної цитометрії в порівнянні з вестерн-блотом є можливість оцінки активності процесів некроптоза в окремих субпопуляціях клітин. Ми вважаємо, що розробка нових методів оцінки активності некроптоза клітин *in vivo* та *in vitro* і вдосконалення вже наявних підходів може поліпшити розуміння ролі даного прозапального виду клітинної смерті в патогенезі різних захворювань.

**Ключові слова:** некроптоз, клітинна смерть, некроз, апоптоз, каспази, діагностика, вестерн-блот, проточна цитометрія.

UDC 547.787.2 + 535.33/.34

**Western Blotting and Flow Cytometry for Evaluating Necroptosis of Cells  
(Review)**

**Tkachenko A. S., Onishchenko A. I., Gopkalov V. G., Gorbach T. V.,  
Kharchenko E. A., Sklyaruk D. O.**

**Abstract.** The paper covers the current mainstream methods used for detecting the intensity of cellular necroptosis, which is considered to be an alternative mode of cell death that shares some features of apoptosis and necrosis. In particular, we have focused on Western blotting and flow cytometry as the basic techniques for evaluating necroptosis. This programmed type of cell death is associated with the cell membrane rupture and the release of intracellular content promoting its pro-inflammatory properties. In this review, we have described the major triggers of necroptosis, its molecular mechanisms, the role of necroptosis in pathogenesis of inflammatory diseases, as well as basic approaches used in the detection of cellular necroptosis intensity.

Nowadays Western blotting and flow cytometry are supposed to be the major techniques used for evaluating the rate of cellular necroptosis. The detection of necroptosis by Western blotting is based on the determination of phosphorylated forms of specific receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK3) and receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1), as well as pseudokinase mixed lineage kinase domain-like protein, involved in the necroptotic cell death signaling. The enzymes mentioned above are phosphorylated and therefore activated only when necroptosis is triggered. In addition, mixed lineage kinase domain-like protein oligomerization detected by Western blotting is also supposed to be a sign of necroptosis.

Flow cytometry allows determining cellular necroptosis using a standard annexin V / propidium iodide kit with the subsequent imaging flow cytometry. Moreover, another flow cytometric approach recently discovered is based on the use of anti-RIPK3 and anti-active caspase-3 fluorescently labeled antibodies. Necroptotic cells are characterized by RIPK3<sup>+</sup>/active caspase-3<sup>-</sup> phenotype, since caspase-3 is not involved in necroptosis but is activated during apoptosis.

It is worth mentioning that the ability to analyze necroptosis in individual cellular subpopulation seems to be an obvious advantage of flow cytometry method compared with Western blotting.

*Conclusions.* We strongly believe that the development of new methods for assessing the activity of cellular necroptosis both *in vivo* and *in vitro* and the improvement of the existing ones can improve the understanding of the role of this pro-inflammatory cell death mode in pathogenesis of various diseases.

**Keywords:** necroptosis, cell death, necrosis, apoptosis, caspases, diagnostics, western blotting, flow cytometry.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Стаття надійшла 29.03.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування