

ApoB 100 Effect to Acute Gouty Arthritis Animal Model

Shelby Amrus Ernanda¹, Andrew Jonatan¹, Nadia Elfira Bilqis¹, Kharisma Ogit Rosandi¹, Bahiratul Nahdliyah¹, Kusworini²

1. Undergraduate student, Faculty of Medicine, University of Brawijaya, Indonesia. 2. Clinical Pathology Department, Faculty of Medicine, University of Brawijaya, Indonesia.

Correspondence Email: shelby.ernanda@gmail.com, Phone: +6281331266585, Address: Perumahan Puri Nirwana Gajayana 36 Malang

Abstract

Introduction: Gouty arthritis is an inflammation of joint induced by deposit of monosodium urate in synovial fluid. Acute gouty arthritis attack is characterized by painful red warm swollen joint and infiltration of polymorphonuclear cells (neutrophils) to synovium. If gout continue to chronic state it can cause joint malformation. Thus gout need to be treated while in acute condition. In vitro studies found that ApoB (Apolipoprotein B100) can reduce inflammation response against uric acid crystal, but in vivo study haven't been conducted. This research aimed to know if ApoB can decrease the number of neutrophils in acute gouty arthritis animal model.

Methods: In vivo true experimental and randomized posttest only controlled group research was conducted in 18-20 weeks old *Rattus norvegicus*. Acute gouty inflammation was induced using 0.25mg/50 μ l monosodium urate (MSU) crystal on dextral genu. Five groups of acute gouty arthritis rats with 5 rats per groups were used for the study. Groups I and II served as non-treated gouty and gouty controls receiving oral colchicine therapy respectively. Groups III, IV, V received intra articular ApoB 1.25 μ g, 2.5 μ g, and 3.75 μ g respectively. 6 hours after injection of ApoB, dextral genu synovium tissues were collected for histopathology anatomy examination. PMN cells were examined in 1000x zoom and 8 observation field for each rat.

Results: Administration of 3.75 μ g ApoB showed significant reduction in number of PMN cells compared to colchicine treated groups (LSD, $p=0.001$). There were also significant correlation between doses of ApoB given and number of PMN cells (Linier Regression test, $p=0.000$, Correlation: -0.833).

Conclusion: We conclude that intra articular injection of ApoB can decrease the number of PMN cells in synovium of acute gouty arthritis animal model. This research suggests that intra articular injection of ApoB hold potency of treatment for acute gouty arthritis.

Keywords: ApoB, PMN, Gouty Arthritis.



Pengaruh Apo B-100 terhadap Jumlah Sel Radang Polimorfonuklear Sinovium Genu Tikus Wistar Jantan (Rattus Norvegicus) Model Inflamasi Akut Arthritis Gout

Shelby Amrus Ernanda¹, Andrew Jonatan¹, Nadia Elfira Bilqis¹, Kharisma Oggit Rosandi¹, Bahiratul Nahdliyah¹, Kusworini².

1. Mahasiswa Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Indonesia. 2. Departemen Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Indonesia. Email Koresponden: shelby.ernanda@gmail.com, Telepon: +6281331266585, Alamat: Perumahan Puri Nirwana Gajayana 36 Malang

Abstrak

Arthritis gout adalah peradangan sendi akibat deposit monosodium urat dalam cairan sinovial. Serangan arthritis gout akut ditandai dengan nyeri, bengkak kemerahan, hangat, dan infiltrasi sel polimorfonuklear/PMN (neutrofil) di sinovium. Kondisi gout yang berlanjut kronis dapat menyebabkan malformasi sendi sehingga gout perlu ditangani sejak akut. Secara *in vitro* dilaporkan bahwa ApoB (Apolipoprotein B100) dapat mengurangi respon inflamasi terhadap kristal asam urat, tetapi penelitian *in vivo* belum dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ApoB dapat menurunkan jumlah PMN dalam hewan model arthritis gout akut. Penelitian *In vivo true experimental and randomized posttest only controlled group* dilakukan pada *Rattus norvegicus* berusia 18-20 minggu. Inflamasi gout akut diinduksi menggunakan 0,25/50 μ l kristal monosodium urat (MSU) pada sendi genu. Penelitian ini menggunakan lima kelompok tikus arthritis gout akut dengan lima tikus per kelompok. Kelompok I adalah kelompok kontrol positif dan kelompok II adalah kelompok pembanding yang diterapi kolkisin. Kelompok III, IV, V masing-masing diinjeksi intra artikular ApoB 1,25 μ g, 2,5 μ g, dan 3,75 μ g. Enam jam setelah injeksi ApoB, jaringan sinovium sendi genu diambil untuk pemeriksaan histologis. Sel PMN diperiksa dengan 1000x perbesaran dan 8 lapangan pandang untuk setiap tikus. Pemberian ApoB 3,75 μ g menunjukkan penurunan signifikan dalam jumlah sel PMN dibandingkan dengan kelompok yang diterapi kolkisin (LSD, $p = 0,001$). Hubungan dosis ApoB dengan jumlah sel PMN juga signifikan (uji regresi linier, $p = 0,000$, korelasi: $-0,833$). Injeksi intra-artikular ApoB dapat menurunkan jumlah sel PMN di sinovium pada hewan model arthritis gout akut. Injeksi intra-artikular ApoB berpotensi sebagai terapi arthritis gout akut.

Kata kunci: ApoB, PMN, Arthritis Gout.



PENDAHULUAN

Arthritis gout adalah peradangan sendi yang disebabkan oleh deposit monosodium urat dalam cairan sinovial. Serangan arthritis gout akut ditandai dengan nyeri, kulit permukaan sendi nampak kemerahan, dan bengkak, terasa hangat, serta infiltrasi sel polimorfonuklear / PMN (neutrofil) ke sinovium. Insiden dan prevalensi arthritis gout di negara berkembang telah mencapai 2-15%. Di Indonesia, prevalensi arthritis gout bisa mencapai 29%, yang merupakan peringkat ketiga di antara penyakit rematik^{1,2}. Jika kondisi gout terus dibiarkan hingga kronis dapat menyebabkan malformasi sendi. Sehingga gout perlu ditangani semenjak dalam kondisi akut. Arthritis gout dimulai dari kondisi hiperurisemia yang mengakibatkan pengendapan kristal monosodium urat (MSU) di sinovium. deposisi ini menginduksi aktivasi komplemen untuk menarik PMN (neutrofil) ke lokasi pengendapan Kristal MSU. Tapi neutrofil yang berusaha mencerna kristal akan mati dan merekrut lebih banyak neutrofil ke situs tersebut dan menyebabkan ledakan peradangan dengan rasa sakit yang hebat di sendi³.

Arthritis gout akut berpotensi untuk diterapi dengan Apolipoprotein B-100 (ApoB). ApoB secara fisiologis ditemukan dalam tubuh manusia sebagai ligan utama untuk reseptor Low Density Lipoprotein (LDL)⁴ dan telah diketahui memiliki hubungan dengan resolusi gout. Suatu penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa kristal MSU yang ditutupi oleh plasma akan kehilangan kemampuannya untuk menginduksi infiltrasi PMN (neutrofil). Efek ini muncul karena Kristal MSU berikatan dengan lipoprotein yang berkorelasi dengan ApoB dari LDL⁵.

Penelitian peran apoB dalam menurunkan peradangan arthritis gout secara *in vivo* dengan sendi sebagai sampel belum pernah dilaporkan, sehingga penelitian lebih lanjut diperlukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ApoB dapat menurunkan jumlah sel PMN di hewan model arthritis gout akut. Selain itu, perlu juga untuk membandingkan efek apoB dengan obat yang umum untuk terapi arthritis gout akut untuk melihat potensi lebih lanjut dari apoB sebagai agen terapi. Kolkisin dipilih untuk

dibandingkan dengan ApoB dalam mengurangi peradangan akut arthritis gout karena kolkisin adalah obat yang umum untuk arthritis gout akut. Penelitian ini akan mengamati dan menganalisis jumlah sel PMN sebagai penan histologis peradangan untuk mengetahui kondisi peradangan⁶.

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian *in vivo true experimental and randomized posttest only controlled group trial*.

Persiapan Hewan

Rattus norvegicus usia 18-20 minggu diperoleh dari Laboratorium Fisiologi Kedokteran Fakultas Universitas Brawijaya. Tikus diadaptasi di laboratorium selama 7 hari dan dibagi menjadi lima kelompok secara acak dengan undian. Kelompok I adalah sebagai kelompok arthritis gout akut tanpa perawatan (kontrol positif) dan kelompok II adalah kelompok pembanding yang diinduksi arthritis gout akut dan diberi kolkisin sebagai terapi. Kelompok III, IV, V masing-masing menerima injeksi intra articular ApoB 1,25 µg, 2,5 µg, dan 3,75 µg. Hewan-hewan coba tersebut diberi pakan 40 gr pelet ayam standar dan air tap *ad libitum*.

Induksi Gout Arthritis Akut

Injeksi intra articular 0,25 mg Monosodium Urat (MSU) yang telah dilarutkan dalam PBS (*Phosphate Buffered Saline*) dengan konsentrasi 1µg/ml dilakukan untuk menginduksi arthritis gout akut pada sendi genu dextra tikus. Induksi dilakukan pada semua kelompok tikus. Dosis MSU diperoleh dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh penulis.

Pemberian Apolipoprotein B-100

Apolipoprotein B-100 atau ApoB diperoleh dari Sigma Aldrich. ApoB diencerkan dalam PBS untuk mencapai konsentrasi 25µg/ml dan pH 7,2-7,4 sebelum injeksi. ApoB disuntikkan secara intra articular ke cairan sinovial dari sendi genu dekstra

pada tikus menggunakan jarum suntik insulin. Injeksi dilakukan di bawah kondisi anestesi oleh ketamin. Kemudian kelompok III, IV, V, masing-masing menerima injeksi intra articular ApoB 1,25 µg, 2,5 µg, dan 3,75 µg. Dosis ini diperoleh dari dosis dikalibrasi untuk menghambat PMN (neutrofil) untuk memfagosit kristal MSU di penelitian *in vitro*⁵.

Pemberian Kolkisin

Kolkisin digunakan sebagai terapi untuk dibandingkan dengan ApoB karena kolkisin adalah obat yang umum untuk mengobati artritis gout akut. Kolkisin diberikan kepada kelompok II rute per oral dengan dosis 0.23mg/kg Berat Badan⁷.

Pengamatan Histologis

Operasi dilakukan untuk mendapatkan jaringan sinovial. Anestesi yang digunakan adalah kloroform secara inhalasi. Sampel darah diperoleh melalui aspirasi intra jantung untuk tujuan penelitian lain menggunakan jarum suntik dan spuit 1 ml. Sendi genu dekstra diperoleh dan difiksasi dalam larutan formalin 10%. Pembuatan preparat histologis dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Preparat diamati melalui mikroskop binokuler pada perbesaran 1000x dan 8 lapang pandang (*high power field*) untuk setiap preparat secara manual untuk menghitung jumlah sel PMN. Perhitungan dari masing-masing lapang pandang kemudian dijumlahkan untuk mengetahui jumlah sel PMN dari masing-masing tikus. Pengamatan dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan berkonsultasi pada Laboratorium Patologi Anatomi Rumah Sakit Syaiful Anwar Malang. Penelitian ini tidak mengidentifikasi sel PMN ke dalamnya subtipe (misalnya basofil, eosinofil, atau neutrofil), karena beluma ada laporan tentang peran jenis lain dari PMN disamping neutrofil dalam patogenesis artritis gout.

Pengumpulan Data dan Analisis

Data diperoleh setelah operasi. Data ini kemudian diuji normalitas dan homogenitasnya. Lalu dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*, uji *Post Hoc Least Significance Difference*, dan uji Regresi Linier juga dilakukan. Semua analisis statistik dilakukan pada nilai alpha = 0,05.

HASIL PENELITIAN

Pengamatan Histologis

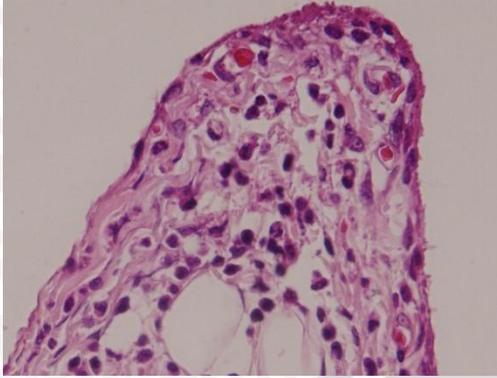
Hasil pengamatan histologis diringkas dalam Grafik 3.1. dan Tabel 3.1. Contoh preparat histologis juga ditampilkan dalam gambar 3.1 hingga gambar 3.5 untuk setiap kelompok.

Tabel 3.1. Rata-rata dan Standar Deviasi dari jumlah sel PMN

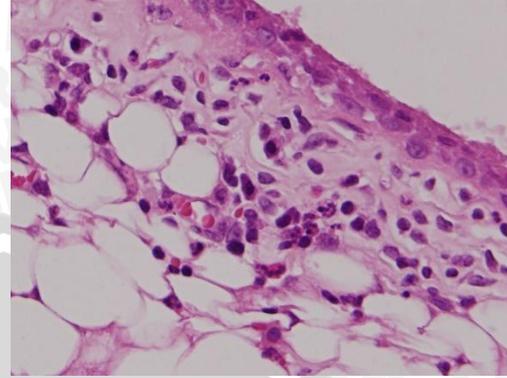
Kelompok	Jumlah Sampel	Rata-rata jumlah sel PMN	Standar Deviasi
I*	5	201.00	± 40.218
II*	5	151.40 [†]	± 13.575
III*	5	141.40 [†]	± 21.113
IV*	5	87.20 [†]	± 28.865
V*	5	81.40 [†]	± 27.808

*Kelompok I dan II secara berurutan adalah kelompok kontrol positif (diinduksi artritis gout akut tanpa terapi) dan kontrol untuk perbandingan yang diinduksi artritis gout akut yang diberi terapi kolkisin per oral. Kelompok III, IV, V masing-masing menerima injeksi intra articular ApoB 1.25 µg, 2.5 µg, dan 3.75 µg.

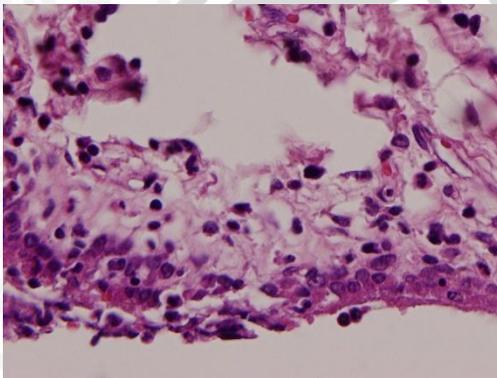
[†]P<0.05, Tes *Least Significance Difference*, dibandingkan dengan kelompok I.



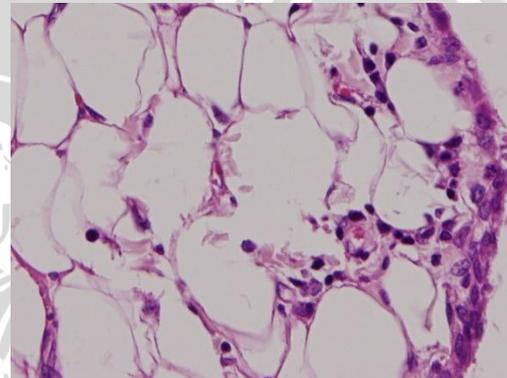
Picture 3.1. Preparat histologis Kelompok I menunjukkan jumlah sel PM tertinggi.



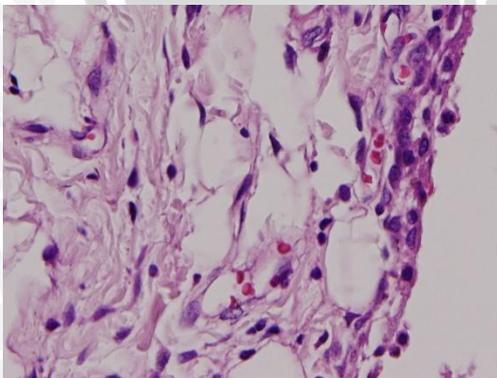
Picture 3.4. Preparat histologis kelompok IV yang menerima ApoB pada dosis 2.5 µg. Jumlah sel PMN secara signifikan lebih rendah daripada kelompok I.



Picture 3.2. Preparat histologis dari kelompok II. Kelompok ini menerima terapi kolkisin per oral. Jumlah sel PMN secara signifikan lebih rendah daripada kelompok I.



Picture 3.5. Preparat histologis kelompok V yang menerima injeksi intra articular ApoB pada dosis 3.75 µg menunjukkan jumlah terendah dari sel PMN



Picture 3.3. Preparat histologis dari kelompok III yang menerima ApoB pada dosis 1.25 µg. Jumlah sel PMN secara signifikan lebih rendah daripada kelompok I.

Analisis Statistik

Uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan uji homogenitas (*Levene test*) dilakukan dan menunjukkan bahwa data jumlah sel PMN berdistribusi normal dan variannya homogen. Sehingga kondisi untuk One-Way ANOVA terpenuhi. Tes One Way-ANOVA menunjukkan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$). Yang berarti bahwa data secara signifikan berbeda dari satu sama lain. Uji *Post Hoc Least Significance Difference (LSD)* kemudian dilakukan yang hasilnya diringkas dalam tabel 3.2.

Tabel 3.2. Nilai Signifikansi (P) dari Uji *Post Hoc* LSD

Kelompok †	I	II	III	IV	V
I		0,010 *	0,003 *	0,000 *	0,000*
II			0,575	0,002 *	0,001*
III				0,006 *	0,003*
IV					0,745
V					

† Kelompok I dan II secara berurutan adalah kelompok kontrol positif (diinduksi artritis gout akut tanpa terapi) dan kontrol untuk pembandingan yang diinduksi artritis gout akut yang diberi terapi kolkisin per oral. Kelompok III, IV, V masing-masing menerima injeksi intra articular ApoB 1.25 µg, 2.5 µg, dan 3.75 µg.

*P<0.05, P<0.05, Tes *Least Significance Difference*, dibandingkan dengan kelompok I.

Uji Regresi Linier menunjukkan hubungan⁸ yang sangat kuat antara dosis ApoB dan jumlah sel PMN jumlah ($p = 0,000$, $r = -0,833$) dan untuk setiap unit penambahan ApoB, jumlah sel PMN mengalami penurunan sebesar 33,040 poin. Dengan demikian

semakin tinggi dosis ApoB maka semakin turun jumlah sel PMN.

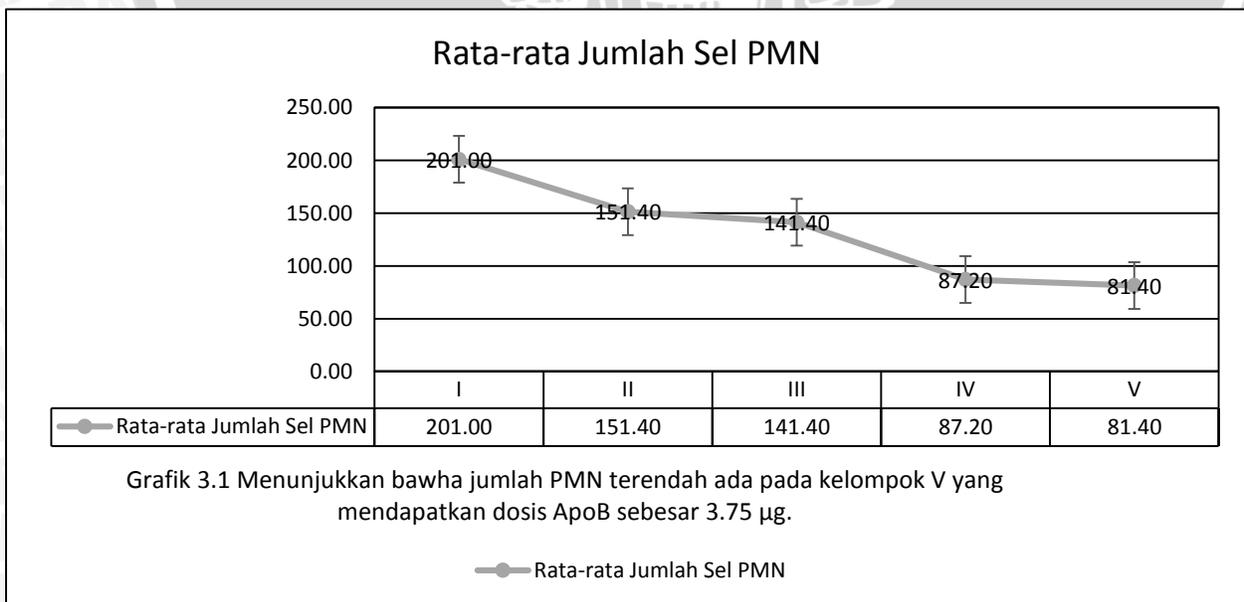
PEMBAHASAN

Tes One-Way ANOVA dilakukan pada jumlah sel PMN dan diperoleh nilai signifikansi adalah 0,000 ($P < 0,05$). Ini berarti bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada kelompok tikus dalam penelitian ini. Kemudian uji *Post Hoc* LSD diperlukan untuk melihat kelompok yang memberikan perbedaan yang signifikan.

Dari tes Post Hoc LSD, ditemukan bahwa jumlah sel PMN berbeda secara signifikan antara kelompok I (kontrol positif, diinduksi artritis gout akut tanpa terapi) dengan kelompok III yang menerima 1,25 µg ApoB ($p = 0,003$). Perbedaan yang signifikan juga ditemukan antara kelompok I dengan kelompok IV yang menerima 2,5 µg ApoB ($p = 0,000$), kemudian antara kelompok I dengan kelompok V yang menerima 3,75 µg ApoB perbedaan juga signifikan ($p = 0,000$).

Uji LSD Post Hoc juga menunjukkan perbedaan yang signifikan antara kelompok II yang menerima terapi kolkisin dengan kelompok III yang menerima 2,5 µg ApoB ($p = 0,002$), dan antara kelompok II dengan kelompok IV yang menerima 3,75 µg ApoB ($p = 0,001$).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada kelompok IV dan V jumlah sel PMN di sinovium sendi



Grafik 3.1 Menunjukkan bahwa jumlah PMN terendah ada pada kelompok V yang mendapatkan dosis ApoB sebesar 3.75 µg.

genu dekstra lebih sedikit daripada kelompok II yang diterapi kolkisin. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Terkeltaub sebagai hasil dari penelitian *in vitro* bahwa interaksi antara PMN (neutrofil) dan kristal urat dihambat oleh kehadiran ApoB⁵. Kehadiran ApoB mampu mengurangi sitolisis dan pembentukan superoksida dari sel PMN (neutrofil). ApoB mampu menyelubungi kristal urat dan menghambat fagositosis sehingga mengurangi reaksi inflamasi dalam serangan artritis gout akut. Penurunan jumlah dari sel PMN juga sejalan dengan penelitian oleh Ortiz yang menyatakan bahwa ApoB mungkin dapat menggeser ikatan IgG dengan kristal monosodium urat, sehingga mencegah peradangan pada tikus model kantung udara⁹. Studi ini menguatkan dugaan bahwa ApoB memiliki peran utama dalam penyelesaian gout artritis.

Namun penelitian oleh Gordon et al tidak menunjukkan efek penghambatan pada pengikatan LDL (yang mengandung ApoB) terhadap kristal MSU di hewan coba model inflamasi kantong udara¹⁰. Ini mungkin karena jumlah kristal MSU yang digunakan terlalu banyak dan *pre-coating* dengan LDL manusia, sedangkan hewan model yang digunakan adalah tikus.

Namun, kelompok perlakuan dengan dosis ApoB 1,25 µg tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan kelompok yang menerima terapi kolkisin. Hal ini mungkin disebabkan oleh jumlah ApoB terlalu sedikit untuk menghambat interaksi antara PMN dengan kristal MSU.

Uji regresi linier menunjukkan korelasi yang sangat kuat⁸ antara dosis ApoB dengan jumlah sel PMN ($p = 0,000$, $r = -0,833$). Hubungan antara dosis ApoB dan jumlah sel PMN menghasilkan nilai kurang dari nol, sehingga berarti semakin besar dosis apoB, semakin sedikit jumlah sel PMN. Tapi dosis optimal ApoB belum dapat diketahui, karena dari seluruh variasi dosis yang diberikan, tidak ada dosis yang memberikan hasil yang sama dengan dosis lain atau dosis yang justru meningkatkan jumlah sel PMN. Sementara efek toksik dan efek samping belum diteliti dalam penelitian ini.

Berdasarkan penelitian ini, diketahui bahwa injeksi intra-artikular ApoB dapat memberikan efek yang signifikan pada penurunan jumlah sel PMN

dalam sinovium sendi genu dekstra tikus Wistar jantan (*Rattus novergicus*) model inflamasi akut artritis gout, kecuali pada dosis 1,25 mg ApoB. Juga ada hubungan yang kuat antara dosis apoB dengan jumlah sel PMN dalam sinovium sendi genu dekstra tikus Wistar (*Rattus novergicus*) jantan model inflamasi akut artritis gout, dengan semakin besar dosis ApoB maka semakin sedikit jumlah sel PMN.

KESIMPULAN

Kami menyimpulkan bahwa injeksi articular intra dari apoB dapat menurunkan jumlah sel PMN di sinovium dari model hewan artritis gout akut. Penelitian ini menunjukkan bahwa injeksi intra articular dari apoB memiliki potensi pengobatan untuk artritis gout akut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dilakukan di bawah pengawasan dan bimbingan oleh dosen penulis. Penulis berterimakasih pada Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK (K) untuk bimbingan pakar, dan juga terima kasih kepada dr. Eviana Norahmawati, Sp.PA (K) untuk bantuan pakar dalam menghitung sel PMN.

DAFTAR PUSTAKA

1. Muchid A. 2006. Pharmaceutical care untuk pasien penyakit arthrititis rematik. Izkaifiz: Direktorat Bina Farmasi Komunitas dan Klinik, Ditjen Bina Kefarmasian dan Alat Kesehatan, Depkes.
2. Muniroh, Lailatul, Santi Martini, Triska Susila Nindya, Rondius Solfaire. 2010. Minyak Atsiri Kunyit Sebagai Anti Radang Pada Penderita Gout Artritis Dengan Diet Tinggi Purin. Makara Kesehatan. 14(2): 57-64
3. Firestein, Gary S., Ralph C. budd., Sherine E. Gabriel., lain B. McInnes., James R. O'Dell. 2013. Kelley's Textbook of Rheumatology, 9th Ed. Elsevier, 1548-1549
4. Teguh, Haryo. 2011. Hubungan Kadar Apolipoprotein B Dengan Aterosklerosis Arteri

Karotis Interna Pada Pasien Pasca Stroke Iskemik. Masters thesis, Diponegoro University.

Pembimbing,

5. Terkeltaub, Robert, Linda K. Curtiss, Andrea J. Tenner, dan Mark H. Ginsberg. 1984. Lipoproteins Containing Apoprotein B Are a Major Regulator of Neutrophil Responses to Monosodium Urate Crystals. *J Clin Invest.* Jun 1984; 73(6): 1719–1730.

Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK
NIP. 19770706 200501 2 001

6. Torres, R., MacDonald, L., Croll, S.D., Reinhardt, J., Dore, A., Stevens, S., Hylton, D.M., Rudge, J.S., Liu-Bryan, R., Terkeltaub, R.A. and Yancopoulos, G.D., 2009. Hyperalgesia, synovitis and multiple biomarkers of inflammation are suppressed by interleukin 1 inhibition in a novel animal model of gouty arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 68(10), pp.1602-1608.

7. Pareek, A., Chandurkar, N., Tenpe, C.R., Yeole, P.G. and Payghan, R., 2011. RESEARCH ARTICLE Evaluation of anti-inflammatory activity of etodolac and colchicine combination in experimental animals.

8. Kadir, A., 2016. ANALISIS PENGARUH PENERAPAN IFRS MENGENAI INVESTMENT PROPERTY TERHADAP PENGAKUAN LABA PERUSAHAAN (STUDI KASUS PADA PT ASTRA INTERNATIONAL TBK., PT ASTRA OTOPARTS TBK., DAN PT ASTRA GRAPHIA TBK. YANG TERDAFTAR DI BEI). *SPREAD Jurnal Ilmiah Bisnis dan Keuangan*, 2(2).

9. Ortiz-Bravo, E., Sieck, M. S., & Ralph Schumacher, H. (1993). Changes in the proteins coating monosodium urate crystals during active and subsiding inflammation. Immunogold studies of synovial fluid from patients with gout and of fluid obtained using the rat subcutaneous air pouch model. *Arthritis & Rheumatism*, 36(9), 1274-1285.

10. Gordon, T. P., Clifton, P., James, M. J., & Roberts-Thomson, P. J. (1986). Lack of correlation between in vitro and in vivo effects of low density lipoprotein on the inflammatory activity of monosodium urate crystals. *Annals of the rheumatic diseases*, 45(8), 673-676.