

Samenvatting

Achtergrond en methode (Hoofdstuk 1)

Reumatoïde artritis (RA) is een auto-immuunziekte, die gekarakteriseerd wordt door chronische ontsteking van de gewrichten met als gevolg afbraak van bot en kraakbeen, functieverlies en ook verhoogde comorbiditeit en sterfte. De prevalentie van de ziekte is ongeveer 1% in de Nederlandse bevolking, waarbij vrouwen ongeveer twee keer zo vaak de aandoening hebben in vergelijking met mannen.

De reden waarom RA ontstaat is onbekend, maar genetische factoren lijken samen met omgevingsfactoren een belangrijke rol te spelen in de pathogenese van de ziekte. Uit studies met tweelingen is gebleken dat ongeveer 60% van het ontstaan van RA verklaard kan worden door genetische factoren. Hierbij spelen vooral genen van het major histocompatibility complex, HLA-DR4 en de shared epitope (SE), een grote rol, maar uit recent onderzoek is gebleken dat ook een aantal andere genen geassocieerd zijn met het hebben van RA, zoals het PTPN22 gen, de 6q23 regio, het STAT4 gen en de TRAF en C5 genen. Omgevingsfactoren die een mogelijke rol spelen in de ontwikkeling van RA zijn onder meer roken, infecties en hormonale factoren.

De gewrichtsschade die ontstaat bij RA is onherstelbaar en zorgt, vooral in een later stadium van de ziekte, voor een verslechterde kwaliteit van leven voor de patiënt. Daarom is het van belang dat de ziekte vroeg opgespoord wordt, omdat door vroege en agressieve behandeling gewrichtsschade te voorkomen is. Toch heeft, ondanks de steeds vroegere opsporing van de ziekte, nog een derde van de RA-patiënten bij het eerste bezoek aan de reumatoloog gewrichtsschade. Omdat de afbraak van bot en kraakbeen al erg snel na de start van de klachten ontstaat, is het van groot belang om toekomstige RA-patiënten al op te kunnen sporen voordat de klachten beginnen. Daarom werd in dit proefschrift de preklinische fase van RA-patiënten onderzocht met als doel het voorspellen van RA in deze fase van de ziekte en het vergroten van het inzicht in de ontstaanswijze van RA.

Voor de studies in dit proefschrift is gebruik gemaakt van seriële bloedmonsters van bloeddonoren die later RA hebben ontwikkeld. De onderzoeken zijn voortgekomen uit een samenwerking tussen de Sanquin Bloedbank Noord-West en het Jan van Breemen Instituut (JBI) in Amsterdam. De Sanquin Bloedbank heeft sinds 1984 van elke bloeddonoratie serum opgeslagen. Het JBI heeft een grote polikliniek reumatologie en van alle patiënten werden er 79 RA-patiënten geïdentificeerd die voor de start van de klachten bloed hebben gedoneerd bij de bloedbank. Per patiënt waren er mediaan 13 serummonsters beschikbaar voor onderzoek en voor ieder patiëntenmonster werd een controle monster gezocht, gematched voor leeftijd, geslacht en het tijdstip van de bloeddonoratie. Daarnaast

werden gegevens van vroege artritis patiënten uit de 'Early Arthritis Clinic' van het JBI gebruikt om de voorspellende waarde van autoantistoffen voor de diagnose RA en radiologische schade te bestuderen.

Preklinische autoantistoffen (Hoofdstuk 2)

Uit eerder onderzoek is naar voren gekomen dat autoantistoffen al jaren voor de start van de klachten van RA te vinden zijn in serummonsters. Door beperkte beschikbaarheid van monsters is het echter nog onbekend hoe het beloop van deze autoantistoffen is voor het ontstaan van de ziekte en welke autoantistoffen het beste gebruikt kunnen worden voor het voorspellen van RA in gezonde personen. De serummonsters van de preklinische RA-patiënten werden in deze studie getest op reumafactor (IgM-RF) en op antistoffen tegen gecitrullineerde eiwitten (anti-CCP). Negenendertig patiënten (49%) werden positief getest op één of beide antistoffen op een mediaan tijdstip van 4.5 jaar (range 0.1 tot 13.8) voor de start van de klachten. Van de 2,138 controles, was 1.1% positief voor IgM-RF en 0.6% was positief op de anti-CCP test. De aanwezigheid van autoantistoffen (IgM-RF en anti-CCP) al jaren voor de start van de klachten impliceert dat gezonde mensen met autoantistoffen in het bloed een verhoogd risico lopen op het krijgen van RA. Dit zou kunnen leiden tot een snellere opsporing van RA in met name hoge risicogroepen.

Preklinische ontsteking (Hoofdstuk 3 en 4)

In twee studies is de mate van ontsteking bij preklinische RA-patiënten bestudeerd. In de eerste studie werd preklinische ontsteking gemeten met behulp van een sensitieve CRP test. In de periodes 0-1 jaar, 1-2 jaar en 4-5 jaar voor de klachten was de mediane CRP concentratie verhoogd bij preklinische RA-patiënten in vergelijking met controles. De CRP concentratie steeg significant over de tijd bij de patiënten met de hoogste waarden in de twee jaar voor de start van de klachten. De verhoogde CRP concentratie werd gevonden bij preklinische patiënten met en zonder de aanwezigheid van autoantistoffen. Ondanks dat de concentratieverschillen tussen patiënten en controles erg klein waren, kan dit een belangrijke voorloper zijn van ontsteking in het klinisch stadium van de ziekte. CRP concentraties zijn echter niet bruikbaar voor voorspelling van de ziekte op individueel niveau.

In de tweede studie werd de tijdsrelatie tussen de start van preklinische ontsteking (gemeten met CRP en sPLA2) en de aanwezigheid van autoantistoffen (IgM-RF en anti-CCP) bestudeerd. De concentraties van deze antistoffen was significant geassocieerd met concentraties van sPLA2, CRP en de combinatie van sPLA2 en CRP op dezelfde momenten voor de start van de klachten. Er

werden geen sterkere associaties gevonden tussen de autoantistoffen en de drie ontstekingsparameters 1, 2 en 3 jaar voor of na het moment van het meten van de autoantistoffen. Hieruit werd geconcludeerd dat de acuut fase respons en de aanmaak van autoantistoffen al jaren voor de eerste symptomen van RA ontstaan en dat deze processen zich waarschijnlijk gelijktijdig ontwikkelen.

Het preklinische lipidenprofiel (Hoofdstuk 5)

RA wordt gekarakteriseerd door verhoogde ontsteking en een verhoogd risico op hart- en vaatziekten. Dit verhoogde risico kan deels verklaard worden door de associatie van ziekteactiviteit en dyslipidemie, maar het is onbekend wanneer deze dyslipidemie ontstaat in het ziekteproces. Daarom werd in de preklinische fase van RA het totaal cholesterol, HDLc, triglyceriden, apo AI, apo B en Lp(a) gemeten en vergeleken met gematchte controles. Bloedmonsters van preklinische RA-patiënten hadden gemiddeld een 4% hoger totaal cholesterol gehalte, een 9% lager HDLc, gehalte, 17% hogere triglyceriden concentratie en een 6% hoger apo B niveau in vergelijking met de controlemonsters ($p < 0.05$). De verschillen tussen de patiënten en controles konden maar beperkt verklaard worden door CRP. Geconcludeerd kon worden dat RA-patiënten al minimaal 10 jaar voor de start van de klachten een meer atherogeen lipidenprofiel hebben in vergelijking met de controles.

Het preklinische vitamine D gehalte (Hoofdstuk 6)

In een recent onderzoek werd een hogere inname van vitamine D via de voeding geassocieerd met een lager risico op het krijgen van RA. Het is echter bekend dat blootstelling aan zonlicht een groter aandeel heeft in de vitamine D aanmaak dan voeding. Omdat de hoeveelheid vitamine D in het lichaam accuraat gemeten kan worden door de 25-hydroxyvitamine D (25(OH)D) concentratie in het serum, werd in deze studie 25(OH)D concentraties van preklinische RA patiënten vergeleken met gematchte controles. Van iedere patiënt werd een serummonster geselecteerd op 1 jaar, 2 jaar en 5 jaar of langer voor de start van de klachten met een bijbehorend controlemonster. Op alle momenten in de preklinische fase werd er geen associatie gevonden tussen vitamine D deficiëntie en het later ontwikkelen van RA. Het geometrisch gemiddelde van de 25(OH)D concentratie was bij de patiënten lager in vergelijking met de controles (29.8 vs. 32.1 nmol/l), maar dit verschil was niet statistisch significant. Geconcludeerd werd dat de 25(OH)D concentratie niet verschilt tussen patiënten en controles. Dit suggereert dat vitamine D geen belangrijke rol speelt in de pathogenese van RA.

Preklinische botmarkers en regulatoren van osteoclast activiteit (Hoofdstuk 7)

In deze studie werd onderzocht of de aanwezigheid van autoantistoffen en ontsteking in de preklinische fase van RA leidt tot veranderingen van het botmetabolisme. Bij preklinische RA-patiënten en controles werden de volgende markers gemeten: 1) markers voor botaanmaak: OC en P1NP, 2) een marker voor botresorptie: β -CTX, en 3) regulatoren van de osteoclastactiviteit: RANKL en OPG. Na correctie voor leeftijd, geslacht en het moment van de bloedafname, autoantistoffen en ontsteking hadden de preklinische RA-patiënten gemiddeld hogere waarden van P1NP and OPG vergeleken met de controles. De preklinische P1NP and OPG concentraties waren negatief geassocieerd met radiologische progressie na de start van de klachten, maar deze associaties waren niet statistisch significant. Geconcludeerd kan worden dat in de preklinische van RA niet alleen autoantistoffen en ontsteking aanwezig zijn, maar dat ook het botmetabolisme afwijkend is.

HLA-DR4 en de Shared Epitope in preklinische RA (Hoofdstuk 8)

In deze studie is de associatie onderzocht tussen genetische markers (HLA-DR4 en SE) en de aanwezigheid van autoantistoffen (IgM-RF en anti-CCP) in preklinische RA-patiënten. Van de 56 preklinische patiënten, waar DNA beschikbaar was, waren 26 patiënten positief voor anti-CCP, (46%), 13 voor IgM-RF (23%), 32 voor HLA-DR4 (57%) and 47 voor SE (84%). Anti-CCP was significant geassocieerd met HLA-DR4 ($p=0.03$, OR: 3.5). De associatie tussen anti-CCP en SE was niet statistisch significant ($p=0.11$, OR: 3.7), wat mogelijk veroorzaakt wordt door het kleine aantal patiënten in deze studie. IgM-RF was niet statistisch significant geassocieerd met HLA-DR4 ($p=0.31$, OR: 2.0) en SE ($p=0.07$, OR onbekend omdat er geen patiënten waren met de combinatie IgM-RF+ and SE-). Geconcludeerd kan worden dat in preklinische RA de aanwezigheid van anti-CCP positief is geassocieerd met HLA-DR4 en SE. Omdat er geen DNA beschikbaar was van controles was het niet mogelijk om de gemeten genetische markers te gebruiken voor predictie van RA in de preklinische fase van de ziekte.

Autoantistoffen bij vroege artritis patiënten (Hoofdstuk 9)

De anti-CCP test heeft een hoge sensitiviteit en specificiteit voor RA, maar CCP is niet het fysiologische doelwit voor de autoantistoffen. Zo is bijvoorbeeld gecitrullineerd fibrine gevonden in ontstoken synovium. Daarom is in deze studie de diagnostische en prognostische waarde van antistoffen tegen gecitrullineerd fibrinogeen (ACF) onderzocht bij vroege artritis patiënten en vergeleken met

IgM-RF en de tweede generatie anti-CCP test. De sensitiviteit van de ACF, anti-CCP en IgM-RF testen waren respectievelijk 55.8%, 57.8%, and 44.6%, met bijbehorende specificiteit van respectievelijk 92.6%, 94.2%, and 96.7%. Ongeveer 30% van de IgM-RF negatieve patiënten bleken positief voor ACF, anti-CCP of beiden. De ACF en anti-CCP test had bij vroege artritis patiënten een hoge mate van overeenstemming ($\kappa = 0.84$). Van alle kenmerken op baseline waren de ACF test en de anti-CCP test de beste voorspeller voor de diagnose RA na 1 jaar follow-up (OR = 10.3 en 10.6) en radiologische progressie na 2 jaar follow-up (OR = 12.1 en 14.8). Uit dit onderzoek kan geconcludeerd worden dat de ACF test even sensitief is als de anti-CCP test, maar sensitiever is in vergelijking met de IgM-RF test voor de diagnose RA bij vroege artritis patiënten. De ACF test is, net als de anti-CCP test, een goede voorspeller van radiologische progressie. Verder lijken de ACF test en de anti-CCP test met name bruikbaar voor het stellen van de diagnose RA bij IgM-RF negatieve artritis patiënten.

Conclusies van dit proefschrift (Hoofdstuk 10)

Op basis van de resultaten van de verschillende studies in dit proefschrift kan geconcludeerd worden dat er al verschillende processen gaande zijn jaren voordat de klachten van RA ontstaan. Een interactie van het genetisch profiel met omgevingsfactoren resulteert in de productie van autoantistoffen (reumafactor en verschillende antistoffen tegen gecitrullineerde eiwitten (ACPA's), ontstekingsparameters (zoals CRP en sPLA2), veranderingen van het botmetabolisme en dyslipidemie.

De behandeling van RA is met name gefocust op het zo vroeg mogelijk opsporen en behandelen van RA om gewrichtsschade zoveel mogelijk te beperken. Met de resultaten van dit proefschrift kan een start gemaakt worden met preventie van RA voordat de ziekte ontstaat, oftewel primaire preventie van RA. Voordat primaire preventie van RA mogelijk is, moeten mensen met een verhoogd risico op de ziekte opgespoord kunnen worden met een of meerdere testen. Van de gemeten parameters in dit proefschrift kunnen alleen antistof-testen, en voornamelijk ACPA, gebruikt worden voor het voorspellen van RA in gezonde individuen. Bij de andere gemeten preklinische parameters waren de verschillen tussen de patiënten en controles te klein om te kunnen gebruiken voor het voorspellen van RA. De aanvullende waarde van genetische testen is onbekend, aangezien van de controles geen DNA beschikbaar was. Door de hoge associatie tussen SE en ACPA is het echter plausibel dat genetische factoren geen aanvullende waarde hebben boven antistoffen voor het voorspellen van RA bij gezonden mensen.

De voorspellende waarde van ACPA in de gezonde bevolking is beperkt. Het risico op het ontwikkelen van RA binnen vijf jaar is voor gezonde mensen met een positieve anti-CCP test geschat op ongeveer 5%. Om de voorspellende waarde van deze test te verhogen, dient de test uitgevoerd worden in hoog risico populaties, zoals gezonde personen met eerstegraads familieleden met RA. In een dergelijke populatie wordt het risico op het ontwikkelen van RA namelijk geschat op ongeveer 70%. Een andere aanpak voor preventie van RA is het voorkomen van het krijgen van de aandoening bij patiënten met artralgie. Artralgie patiënten hebben nog geen gewrichtsontsteking maar al wel pijnlijke en stijve gewrichten, wat de eerste symptomen kunnen zijn van RA. Het is aannemelijk dat dergelijke patiënten een verhoogde kans hebben op het ontwikkelen van RA, waardoor autoantistoffen ook in deze populatie een goede voorspellende waarde zouden kunnen hebben voor het ontwikkelen van RA. Voor de opsporing van deze patiënten is een belangrijke rol weggelegd voor de huisarts, aangezien dit de eerste professional is die deze patiënten op het spreekuur ziet. Om preventie van RA in dit stadium van de ziekte mogelijk te maken, zal de huisarts artralgie van handen en voeten in combinatie met ochtendstijfheid (inflammatoire artralgie) moeten kunnen onderscheiden van andere soorten gewrichtspijn, deze patiënten testen voor ACPA en IgM-RF en vervolgens de positief geteste patiënten verwijzen naar de reumatoloog. Naast herkenning en opsporing, zal er ook een (kosten-)effectieve interventie moeten worden ontwikkeld, voordat er werkelijk gesproken kan worden van primaire preventie van reumatoïde artritis.

Dankwoord

Na bijna acht jaar is het dan eindelijk zo ver: mijn proefschrift is klaar! Natuurlijk heb ik dit niet in mijn eentje gedaan en wil ik dit laatste gedeelte van mijn boekje gebruiken om een aantal mensen te bedanken.

Allereerst gaat mijn dank uit naar mijn promotor prof.dr. Ben Dijkmans en mijn copromotoren dr. Dirkjan van Schaardenburg en dr. Irene van der Horst-Bruinsma. Jullie hebben me de kans gegeven om me te kunnen ontwikkelen als onderzoeker. Ondanks dat er af en toe wat strijd is gevoerd, denk ik dat de combinatie van epidemiologie en geneeskunde uiteindelijk een prachtig proefschrift op heeft geleverd. Uiteraard wil ik ook de leden van de leescommissie, bestaande uit: prof.dr. L. Aarden, prof.dr. M. Boers, prof.dr. T. Huizinga, prof.dr. J. Twisk, prof.dr. W. van Venrooij en prof.dr. C. Verweij, danken voor de kritische beoordeling van dit proefschrift.

Zonder de hulp van bloeddonoren was dit proefschrift niet tot stand gekomen. Hiervoor wil ik dr. Henk Reesink en Moud Habibuw van de Sanquin bloedbank in Amsterdam danken voor de mogelijkheid tot het gebruiken van deze unieke bloedmonsters uit de vele vriezers van de bloedbank. Natuurlijk dank ik hierbij ook de patiënten die hun toestemming hebben gegeven voor het gebruik van dit prachtige materiaal.

Ook dank ik al mijn collega's op het JBI voor de vier leuke jaren die ik daar heb gehad. Ondanks dat ik niet altijd de meest makkelijke persoon was om mee te werken, stonden jullie altijd voor me klaar en voelde ik me altijd erg goed thuis op het JBI. Anne-Marie en Elleke, ondanks dat er maar weinig EAC-gegevens voor dit proefschrift zijn gebruikt, dank ik jullie voor de prettige samenwerking. Ik ben blij dat ik via jullie heb geleerd hoe het is om met reumapatiënten te werken. Hiervoor blij je toch andere skills nodig te hebben dan het werk achter de computer. Verder dank ik Els Klink en Remke Albers voor alle gezelligheid en hulp in de bibliotheek. Jullie waren altijd een luisterend oor, wanneer er weer eens iets niet naar mijn zin was.... Natuurlijk dank ik ook de mensen van het lab, met in het bijzonder Rob van de Stadt, Truus de Gast en Margret de Koning. Margret, zonder jouw fantastische werk was dit proefschrift nooit tot stand gekomen! Voor de data-entry wil ik Sanne en Sebastiaan danken voor het snelle en secure werk dat jullie hebben geleverd. Ook dank ik alle paramedici en de

onderzoekers van de afdeling revalidatie voor de leuke tijd tijdens het sporten, stappen en uitjes.

Ten slotte dank ik natuurlijk mijn collega-onderzoekers van het JBI, met in het bijzonder Vokko van Halm, Marijn Vis en Marcel van de Paardt. Vokko, het was geweldig om met jou al die jaren een (woon)kamer te delen. Ik kon me geen betere kamergenoot wensen! Ik hoop dat we weer snel een biertje gaan drinken nu alle drukte achter de rug is. Marijn, naast al het geschreeuw op de onderzoekerskamer hebben we ook leuke tijden gehad met het darten. Het wordt weer tijd dat de knijper zijn kunsten komt vertonen! Marcel, we zullen elkaar hopelijk nog vaak zien nu we allebei in de huisartsgeneeskunde zijn beland. Izhar, Wouter, Mike en Jennie, jullie waren onze opvolgers, maar hadden me bijna ingehaald. Ik ben blij dat ik jullie nog geregeld zie tijdens of na het werk. Wouter en Mike, ik weet zeker dat we elkaar de komende jaren nog wetenschappelijk (en sociaal) lastig gaan vallen! Als laatste gaat mijn speciale dank uit naar Marga Kammeijer, onze onderzoeksmama. Marga, het was fijn om naast alle mannen ook nog een dame op de kamer te hebben. Je luisterend oor, gezelligheid en liefde waren onmisbaar tijdens mijn hele periode op het JBI. Ik ben blij je nog met regelmaat te spreken!

Na het JBI ben ik aan de slag gegaan bij het NIVEL. Voor het inhoudelijke gedeelte kan ik niemand bedanken, maar wel dank ik mijn collega's voor de onuitputtelijke interesse in de voortgang van mijn proefschrift en de goede stemming, waardoor ik me al snel thuis voelde op het instituut. In het bijzonder wil ik de Mariekes, Michelle, Thijs en William bedanken voor al het plezier op en buiten het NIVEL. Ook wil ik Robert, François en Dinny danken voor de mogelijkheid om eindelijk mijn proefschrift af te kunnen schrijven en Marina voor de prachtige opmaak van mijn boekje.

Naast alle collega's, wil ik natuurlijk al mijn vrienden en vriendinnen danken voor de mental support en de nodige afleiding naast het werk. Onder meer het jaarlijkse weekje Spanje, de wekelijkse dartswedstrijden in de Clipper en alle concerten zorgen voor ervoor dat ik nooit zal vergeten dat er belangrijkere zaken zijn dan alleen maar werken. Ik ben blij dat twee belangrijke mensen, Joost en Marieke, tijdens de promotie naast me staan. Het is een eer dat jullie als paranimfen de promotie samen met mij van dichtbij zullen meemaken!

Tot slot wil ik mijn ouders en mijn zusje Vera danken. Pa en ma, bedankt voor jullie onvoorwaardelijke steun en liefde en de kans die ik heb gekregen om het zo ver te schoppen in de wetenschap. Vera, je bent een schatje!

Reference list of the author

1. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(2):380-6.
2. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, Twisk JW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Gast T, Habibuw MR, Vandenbroucke JP, Dijkmans BA. Increased levels of C-reactive protein in serum from blood donors before the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004; 50(8):2423-7.
3. Nielen MM, van der Horst AR, van Schaardenburg D, van der Horst-Bruinsma IE, van de Stadt RJ, Aarden L, Dijkmans BA, Hamann D. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005; 64(8):1199-204.
4. Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, Twisk JW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Dijkmans BA. Simultaneous development of acute phase response and autoantibodies in preclinical rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65(4):535-7.
5. van Eijk IC, Nielen MM, van Soesbergen RM, Hamburger HL, Kerstens PJ, Dijkmans BA, van Schaardenburg D. Cervical spine involvement is rare in early arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2006; 65(7):973-4.
6. Nielen MM, van Schaardenburg D, Lems WF, van de Stadt RJ, de Koning MH, Reesink HW, Habibuw MR, van der Horst-Bruinsma IE, Twisk JW, Dijkmans BA. Vitamin D deficiency does not increase the risk of rheumatoid arthritis: comment on the article by Merlino et al. *Arthritis Rheum.* 2006; 54(11):3719-20.
7. van Halm VP, Nielen MM, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Reesink HW, Voskuyl AE, Twisk JW, van de Stadt RJ, de Koning MH, Habibuw MR, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans BA. Lipids and inflammation: serial measurements of the lipid profile of blood donors who later developed rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2007; 66(2):184-8.
8. Ursum J, Nielen MM, van Schaardenburg D, van der Horst AR, van de Stadt RJ, Dijkmans BA, Hamann D. Antibodies to mutated citrullinated vimentin and disease activity score in early arthritis: a cohort study. *Arthritis Res Ther.* 2008; 10(1):R12.
9. Bos WH, Nielen MM, Dijkmans BA, van Schaardenburg D. Duration of pre-rheumatoid arthritis anti-cyclic citrullinated peptide positivity is positively associated with age at seroconversion. *Ann Rheum Dis.* 2008; 67(11):1642.
10. Nielen MM, Lems WF, Twisk JW, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MH, Habibuw MR, Dijkmans BA, van Schaardenburg D. Bone metabolism is altered in preclinical rheumatoid arthritis. *Submitted.*
11. Nielen MM, van der Horst-Bruinsma IE, van Schaardenburg D, van de Stadt RJ, Reesink HW, Crusius B, Dijkmans BA. HLA-DR4 and antibodies against cyclic citrullinated peptides are associated in preclinical rheumatoid arthritis. *Submitted.*

Reference list of the author

12. Peters MJ, Visman I, Nielen MM, van Dillen N, Verheij RA, van der Horst-Bruinsma IE, Dijkmans BA, Nurmohamed MT. Increased Cardiovascular Disease in Ankylosing Spondylitis: a cross-sectional survey. The CARAS investigation. *Submitted*.
13. Peters MJ, Nielen MM, Raterman HG, Verheij RA, Schellevis FG, Nurmohamed MT. Increased cardiovascular disease in inflammatory arthritis patients in primary care: a cross-sectional observation. *Submitted*.