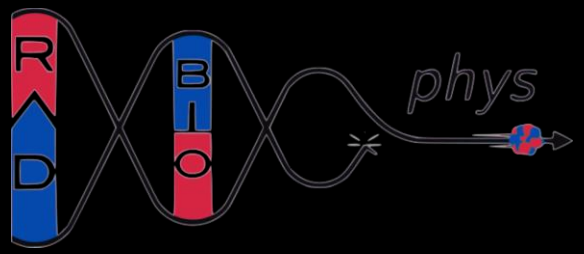
Tissue is the issue

Multi-omica spaziale per lo studio dei sistemi biologici

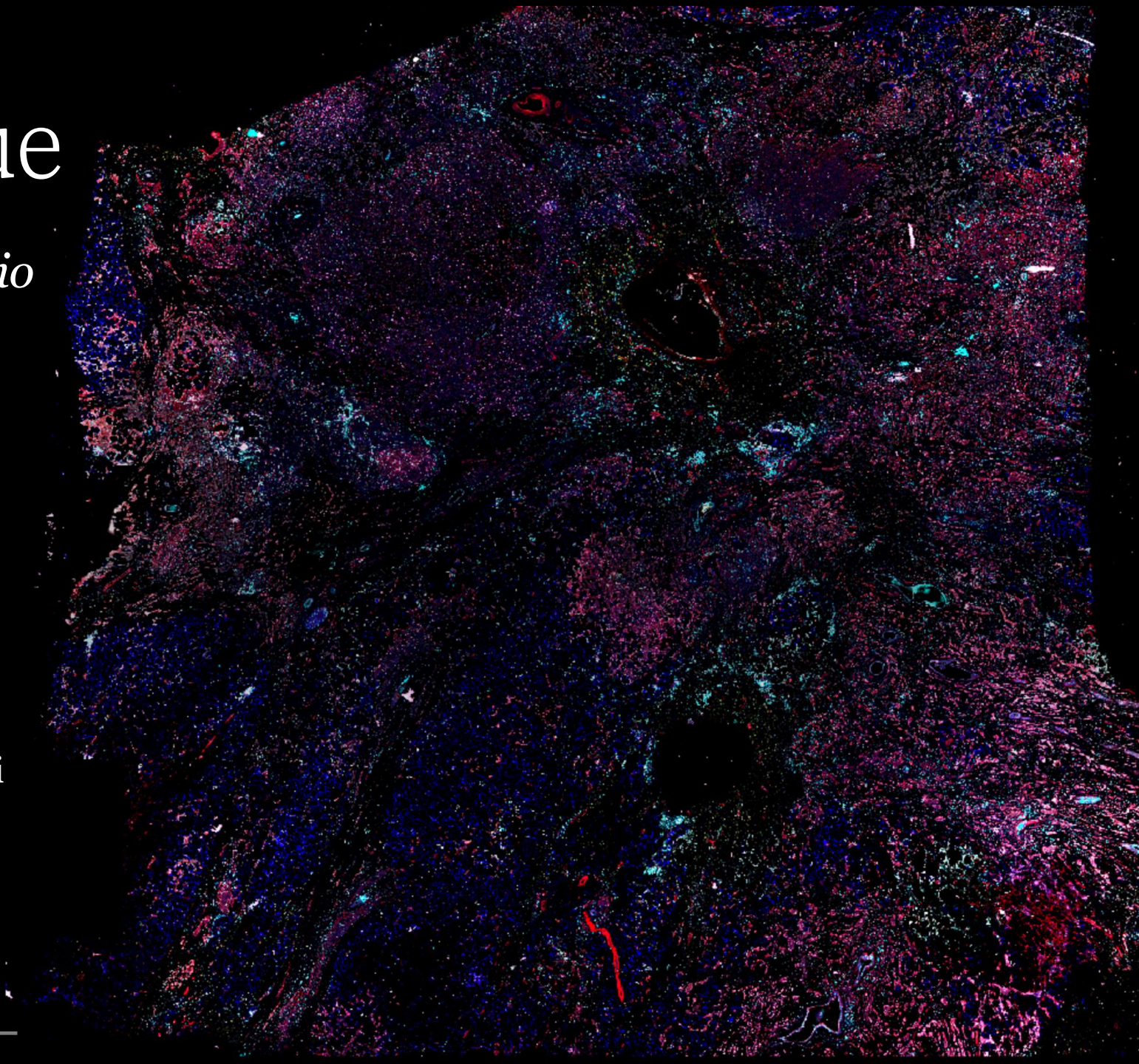


Incontri di Fisica Moderna 2026

Leonardo Lonati, Alice Mentana, Cecilia Riani



UNIVERSITÀ
DI PAVIA



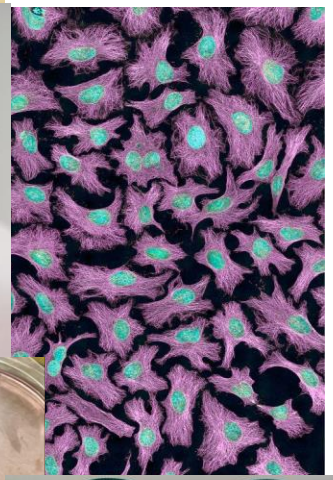
Radiation Biophysics and Radiobiology Lab @ UniPv

- Misure di radiobiologia, modelli computazionali, bioinformatica, analisi dei dati biologici
- Laboratori: camera sterile per la coltura cellulare e locali per il trattamento dei campioni.
- Campioni in vitro (2D e 3D) ed ex vivo













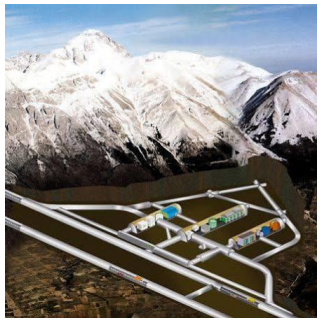
Agenzia Spaziale Italiana

CNAO
Centro Nazionale di Adroterapia Oncologica

PIANFORTE
EUROPEAN PARTNERSHIP FOR RADIATION PROTECTION RESEARCH

UNIVERSITÀ DI PAVIA
Dipartimento di Medicina Molecolare

INFN
Laboratori Nazionali del Gran Sasso



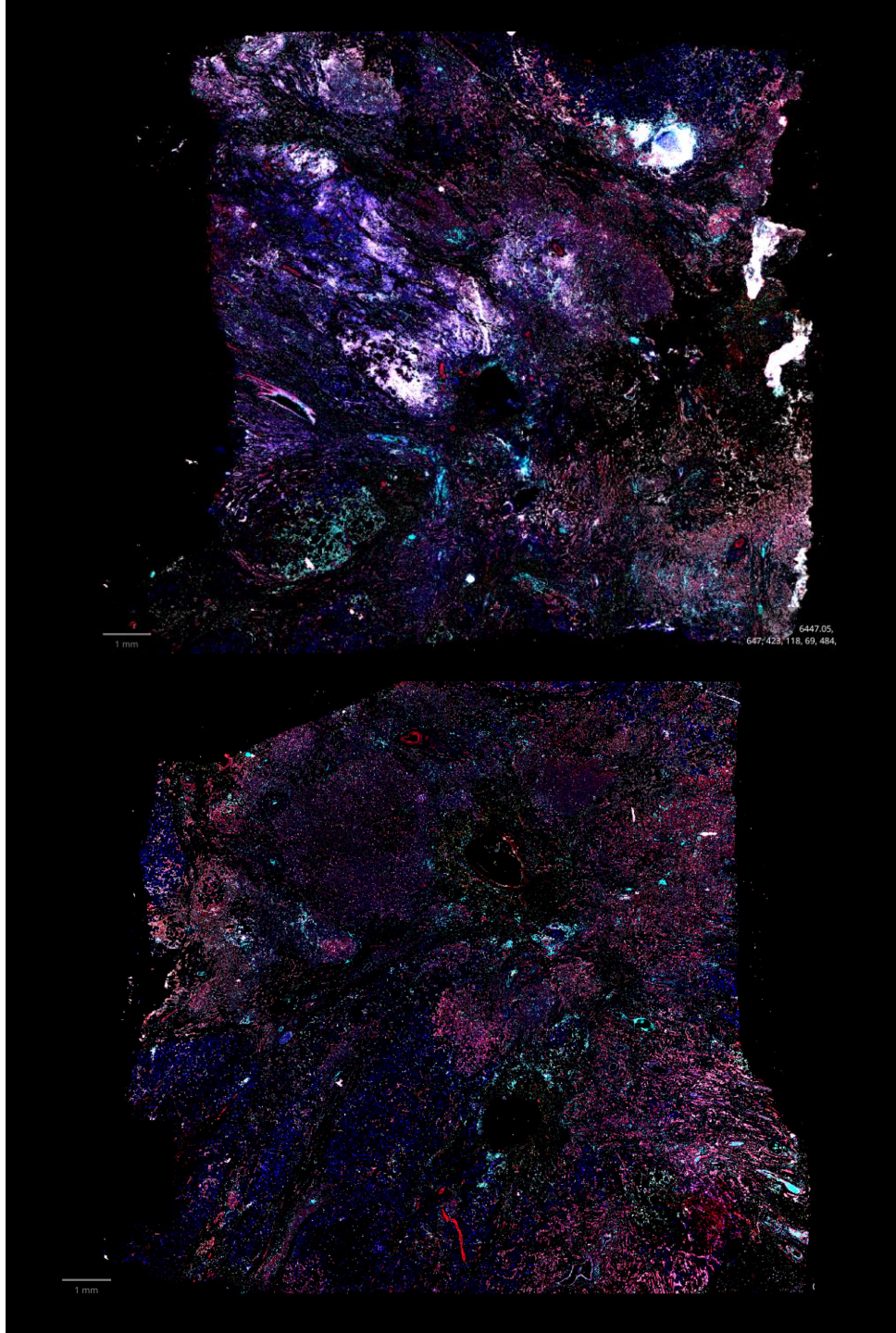
OSPITALE DI S. MATTEO
PAVIA

Istituti Clinici Scientifici Maugeri

Tissue is the issue

Multi-omica spaziale per lo studio di sistemi biologici

1. Introduzione: dal tessuto alle osservabili molecolari
2. Omiche spaziali: le tecniche di misura
3. Come si analizzano i dati multi omici spaziali?
4. Conclusioni e prospettive future



Una città è ...



Che cosa serve per capire come funziona?

- **Abitanti**
  numerosi e diversi
- **Quartieri**
  con caratteristiche specifiche
- **Infrastrutture**
  strade, ponti, reti idriche ed elettriche
- **Scambi e comunicazioni**
  relazioni tra persone e luoghi
- **Attività**
  lavoro, commercio, servizi

...dalla città al tessuto...



Abitanti	→	Cellule
Mestieri e ruoli	→	Tipi e identità cellulari
Quartieri	→	Regioni e compartimenti
Infrastrutture	→	Stroma, matrice e vasi
Messaggi e scambi	→	Segnali e interazioni
Attività della città	→	Funzioni biologiche

Tre modi di studiare la stessa città

BULK



l’informazione aggregata

Segnale globale

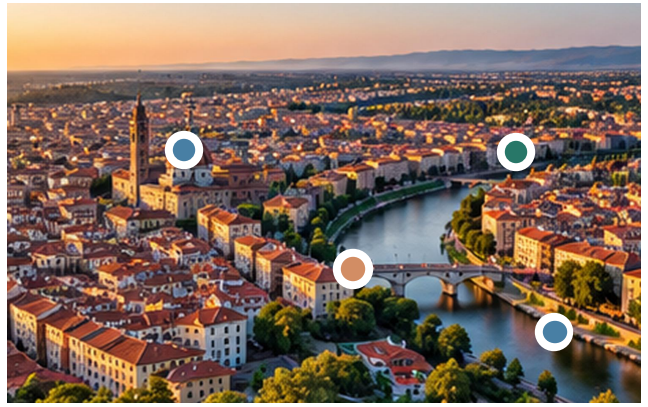
SINGLE-CELL



gli abitanti uno per uno

Caratteristiche individuali; posizione spesso persa

SPATIAL



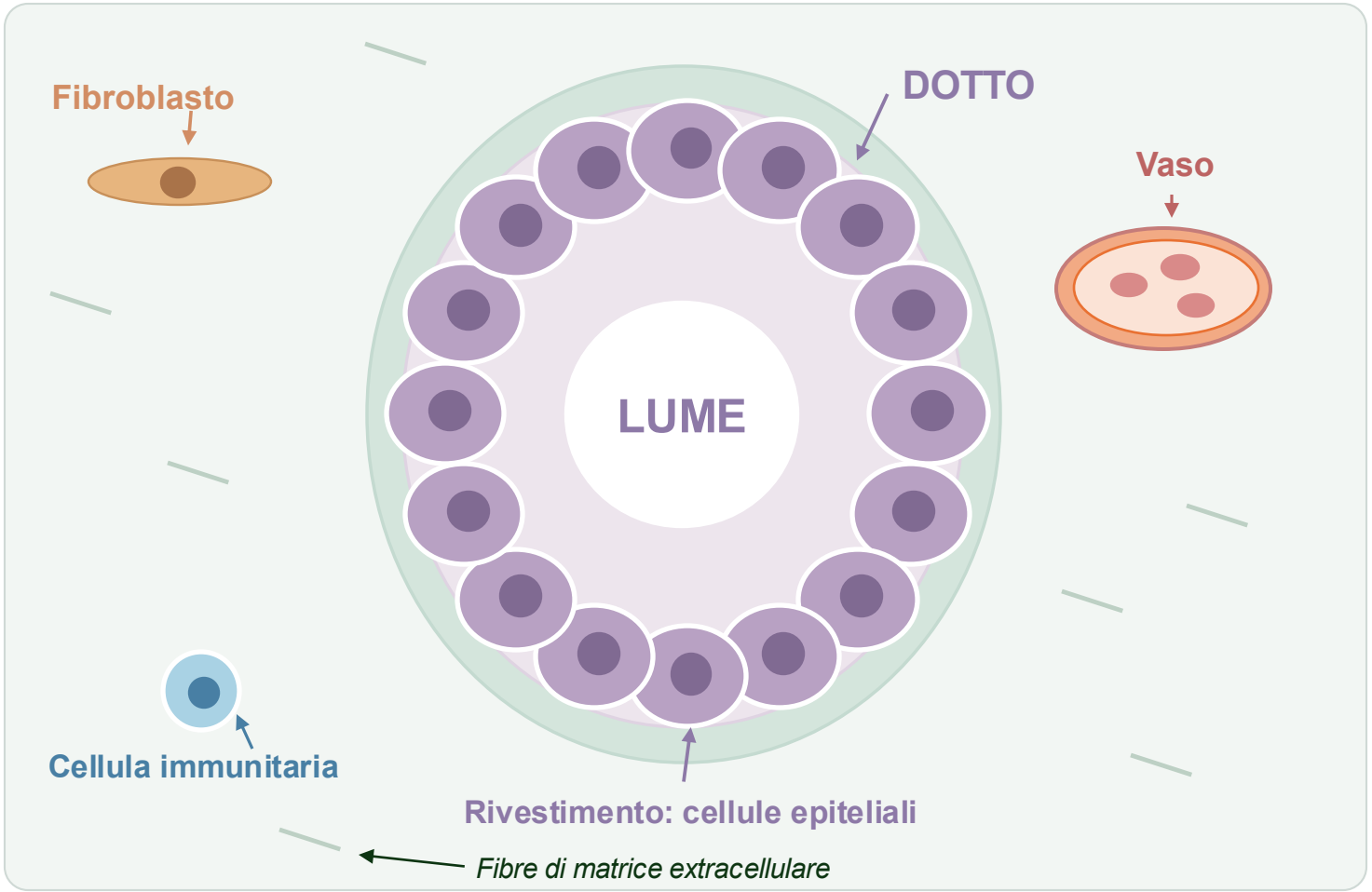
le informazioni sulla mappa

Caratteristiche + posizione

Non basta sapere chi c’è: conta anche sapere dove si trova!

Che cosa vediamo in un tessuto?

Schema semplificato (non esaustivo) di «tessuto mammario» (piccola regione dell'organo mammella)



PARENCHIMA GHIANDOLARE

DOTTO trasporta il latte (attraverso la cavità LUME) ed è rivestito da cellule epiteliali

STROMA

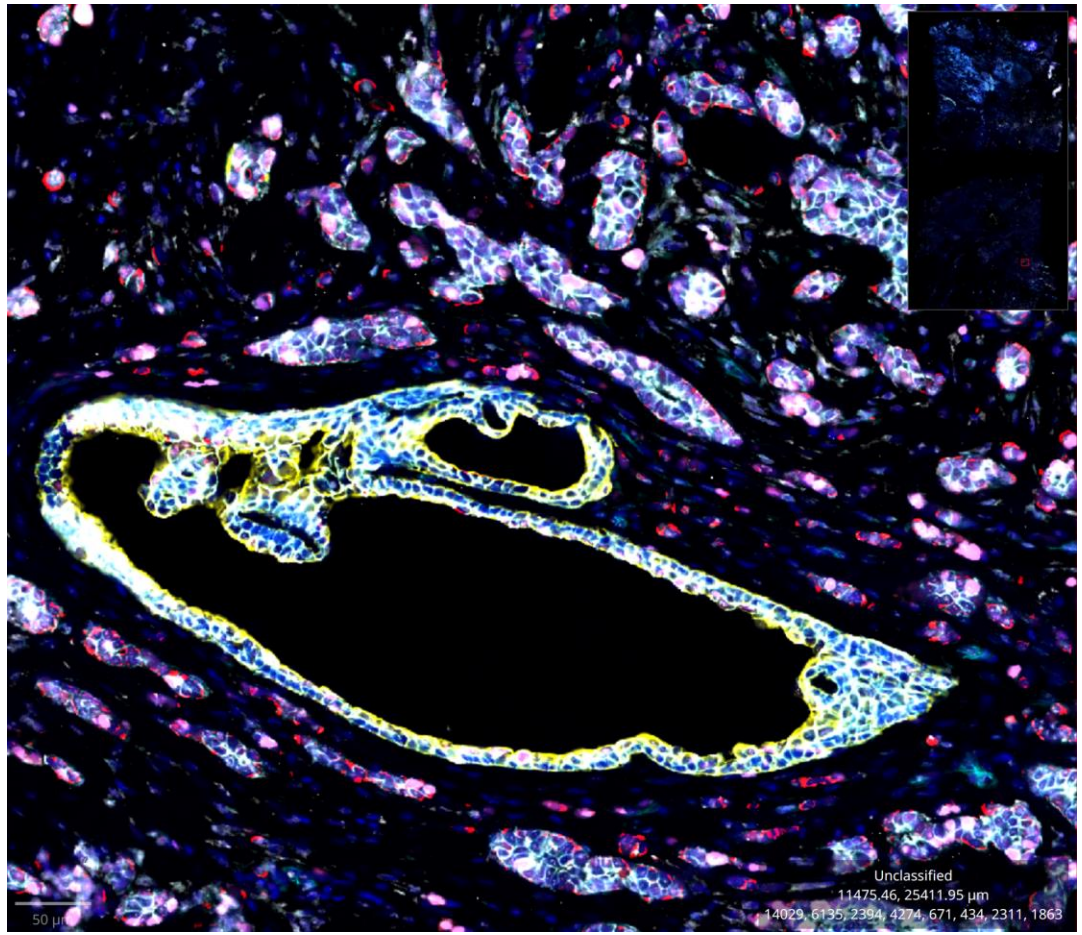
tessuto connettivo di sostegno (con cellule come i fibroblasti e matrice extracellulare), vasi ed altre componenti

MICROAMBIENTE

L'insieme delle condizioni ed interazioni locali che influenzano una cellula

Che cosa vediamo in un tessuto?

Immagine di miscroscopia a fluorescenza di «tessuto mammario» (piccola regione dell'organo mammella)



PARENCHIMA GHIANDOLARE

DOTTO trasporta il latte (attraverso la cavità LUME) ed è rivestito da cellule epiteliali

STROMA

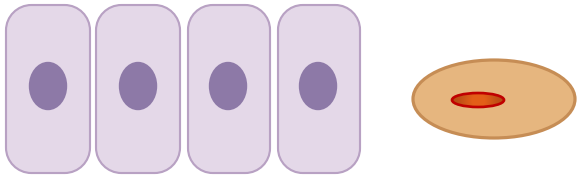
tessuto connettivo di sostegno (con cellule come i fibroblasti e matrice extracellulare), vasi ed altre componenti

MICROAMBIENTE

L'insieme delle condizioni ed interazioni locali che influenzano una cellula

La cellula: identità, stato e posizione

IDENTITÀ

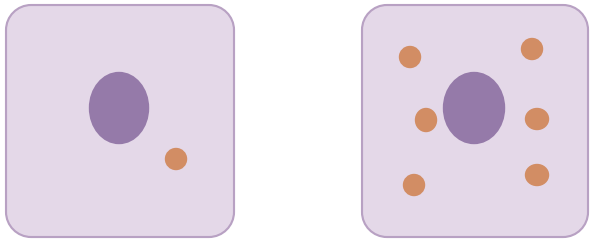


cellule epiteliali fibroblasto

Che tipo di cellula è?

Forma, funzione

STATO

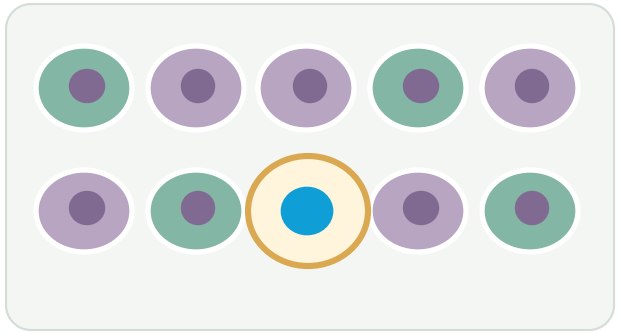


pochi segnali molti segnali

In che condizione è?

Stesso tipo - attività molecolare diversa

POSIZIONE



vicini e ambiente locale

Dove si trova?

Relazioni possibili con altre cellule

Il DNA contiene geni: che cos’è un gene?

DNA: una sequenza di nucleotidi con quattro basi principali



La sequenza delle basi contiene l’informazione genetica.
→ genoma umano: 3.1 miliardi di coppie di basi

GENE

Unità funzionale dell’informazione genetica:

regione di DNA la cui informazione è utilizzata per produrre un RNA funzionale e, per i geni codificanti ($2 \cdot 10^4$), una proteina.

Come viene utilizzata l’informazione di un gene?

Esempio: un gene che codifica una proteina

DNA · GENE



informazione genetica

trascrizione

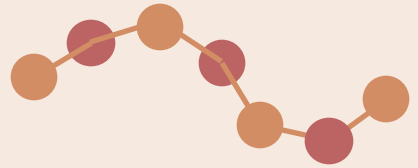
RNA MESSAGGERO (mRNA)



RNA che porta le istruzioni

traduzione

PROTEINA

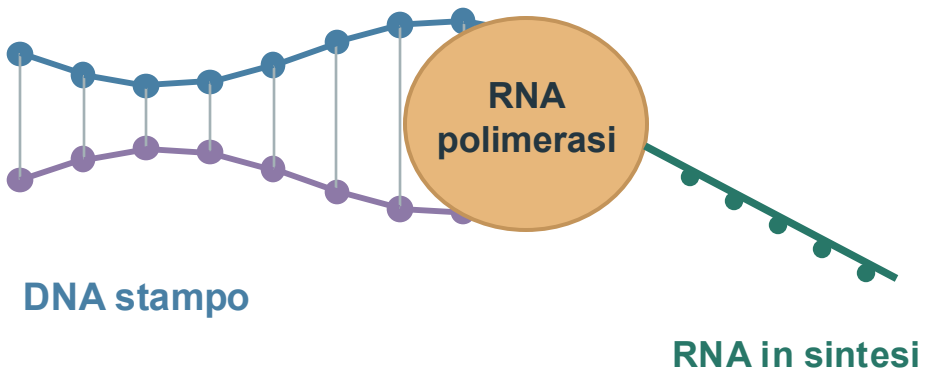


catena di amminoacidi

Espressione genica Insieme delle molecole di RNA messaggero corrispondente a un gene.

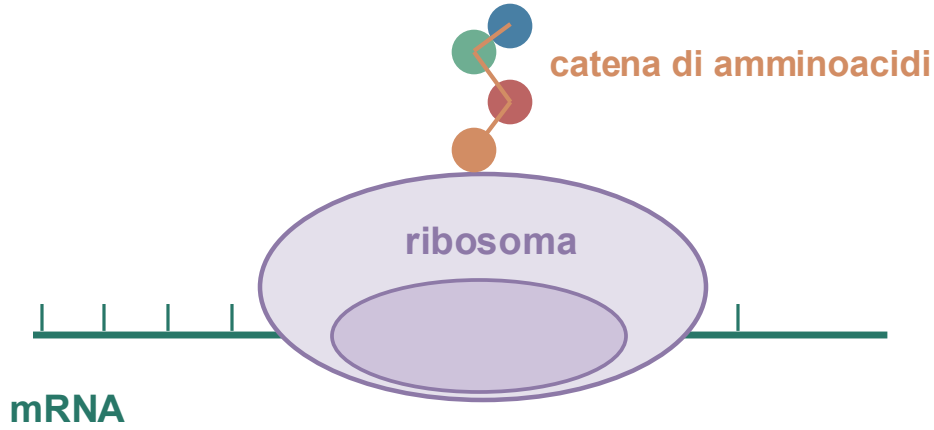
Trascrizione e traduzione: due processi distinti

1 · TRASCRIZIONE



L’enzima legge il DNA e sintetizza RNA.

2 · TRADUZIONE



Il ribosoma legge l’mRNA e assembla la proteina.

*Per i geni codificanti umani, il trascritto subisce un insieme di trasformazioni (**maturazione**) prima di essere tradotto.*

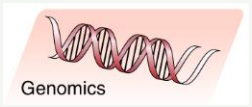
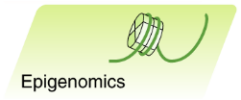
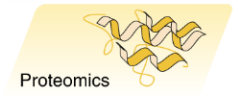
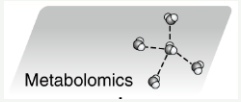
Che cosa possiamo misurare — e che cosa ci dice?

DNA	**Informazione genetica** Sequenze, varianti e caratteristiche del genoma	**Quale patrimonio genetico possiede?**
RNA	**Trascritti presenti** Quali RNA e in quale abbondanza	**Quali geni sono espressi?**
PROTEINE	**Prodotti molecolari** Quali proteine e in quale quantità / localizzazione	**Quali funzioni molecolari sono effettivamente presenti?**

Non sono misure equivalenti: più RNA non significa automaticamente più proteina…

Studiare il sistema su più livelli: la multiomica

Omica = studio su larga scala di una classe di componenti molecolari.

	**GENOMICA**	DNA / genoma
	**EPIGENOMICA**	Regolazione del genoma
	**TRASCRITTOMICA**	RNA presenti
	**PROTEOMICA**	Proteine presenti
	**METABOLOMICA**	Metaboliti

MULTIOMICA = integra informazioni provenienti da due o più livelli omici.

Multiomica e spazio: due informazioni complementari

1 · PIÙ LIVELLI MOLECOLARI

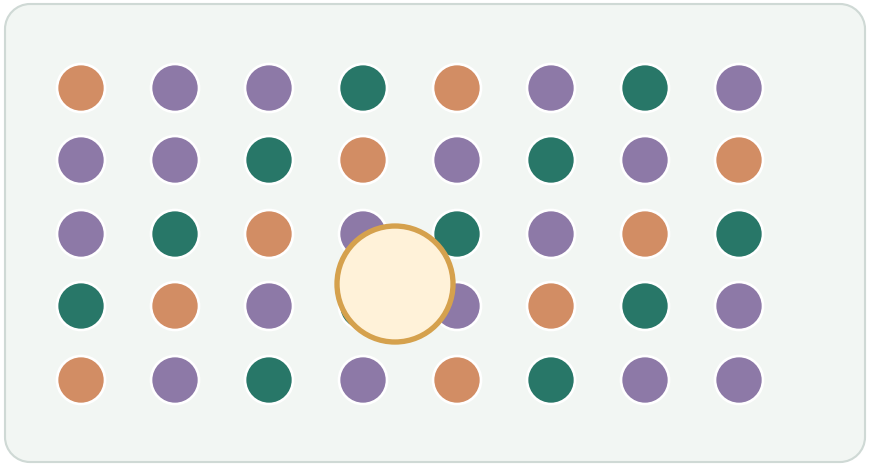
RNA

proteine



Due misure diverse sulla stessa regione

2 · INFORMAZIONE SPAZIALE

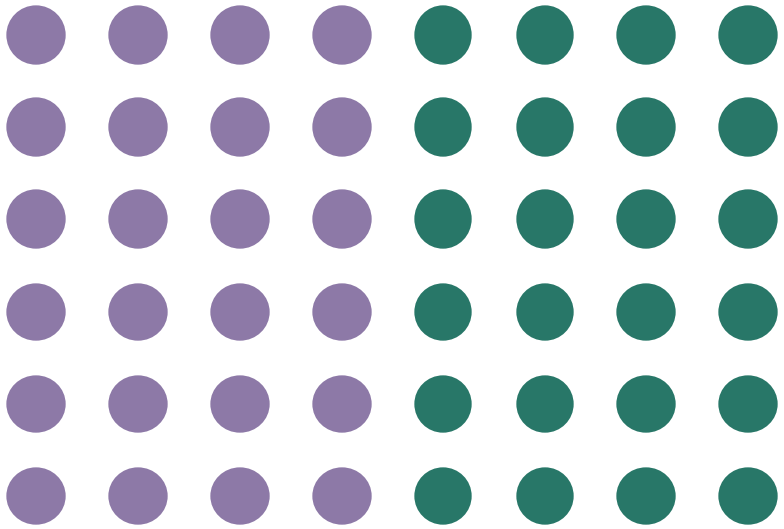


Dove nel tessuto?

Perché è importante l’informazione spaziale?

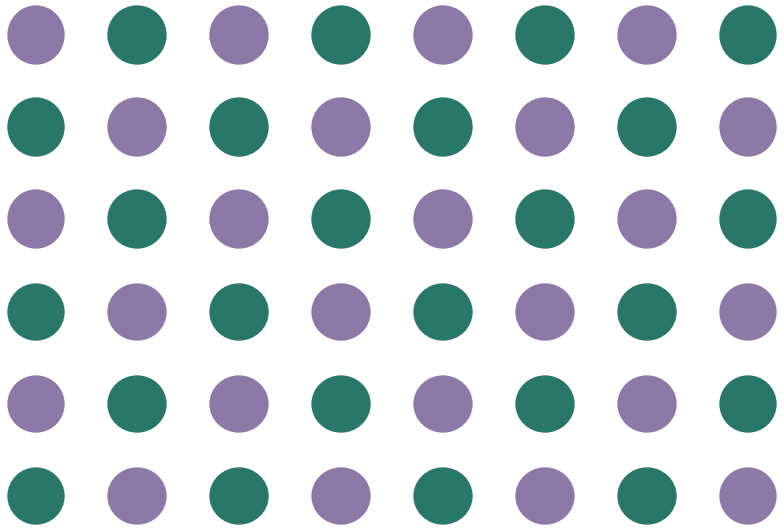
Dopo aver misurato RNA e/o proteine, la posizione può aggiungere un’informazione decisiva.

TESSUTO A



Popolazioni separate

TESSUTO B



Popolazioni mescolate

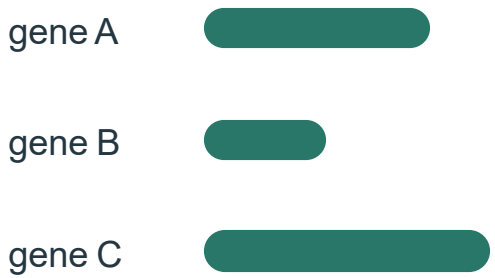
Stessi numeri e tipi cellulari; vicinati e opportunità di interazione differenti.

Quale misura distingue i due tessuti?

Riprendiamo i 3 approcci di misura.. nei sistemi biologici

BULK

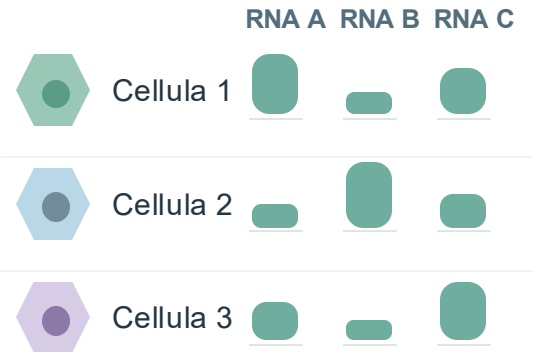
Profilo aggregato



Non conserva i vicinati.

SINGLE-CELL

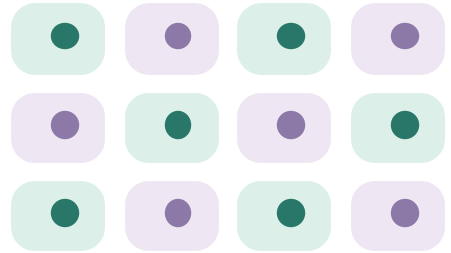
Profili per cellula



Con dissociazione, la posizione si perde.

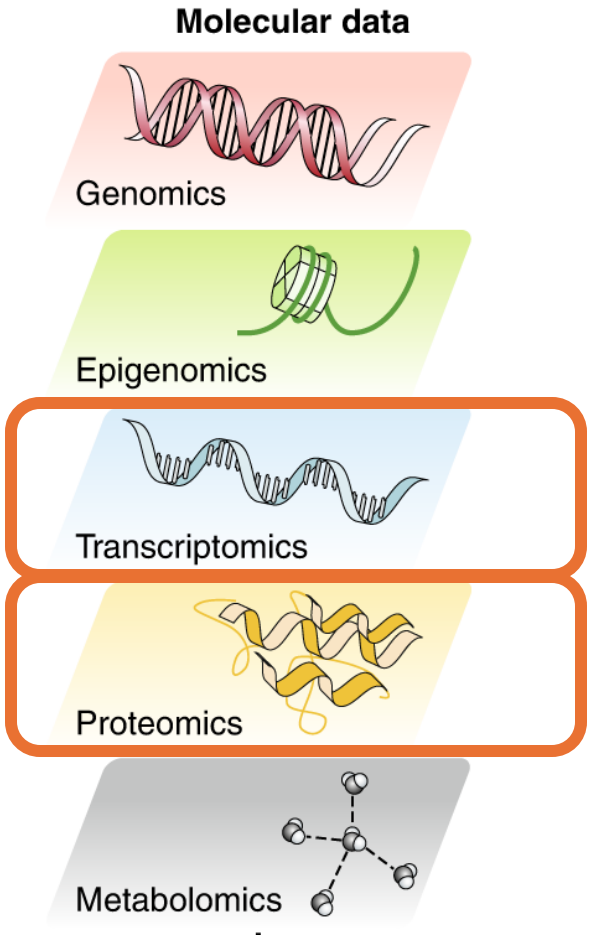
SPATIAL

Profili + posizione



Può distinguere i diversi vicinati.

Multi-Omiche



DNA 3.1×10^9 bp; ~2×10^4 geni codificanti (1–2% del genoma)

RNA 10^5–10^6 molecole di mRNA per cellula; 10^3–10^4 geni espressi; abbondanze distribuite su **5 ordini di grandezza** (da 1 a 10^5 copie per gene)

PROTEINE >10^4 specie diverse per cellula, con dinamica analoga a mRNA

→ Il problema comune**: rivelare 1 copia in un fondo di 10^5**

Come ottengo i dati multi-omici spaziali?

Trascrittomica

contare molecole discrete di mRNA trascritte, in ogni spot dell'immagine.

Proteomica

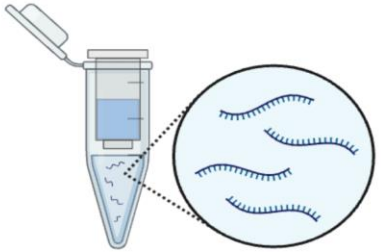
localizzare le proteine espresse come fluorescenza continua

Compromesso

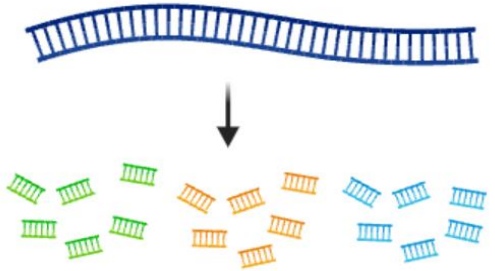
risoluzione spaziale vs copertura molecolare

Tecnica: RNA sequencing

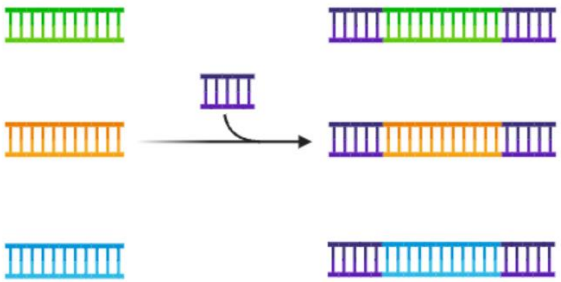
1. Estrazione di RNA



2. Frammentazione e conversione in cDNA



3. Preparazione della Libreria



4. Amplificazione dei Cluster

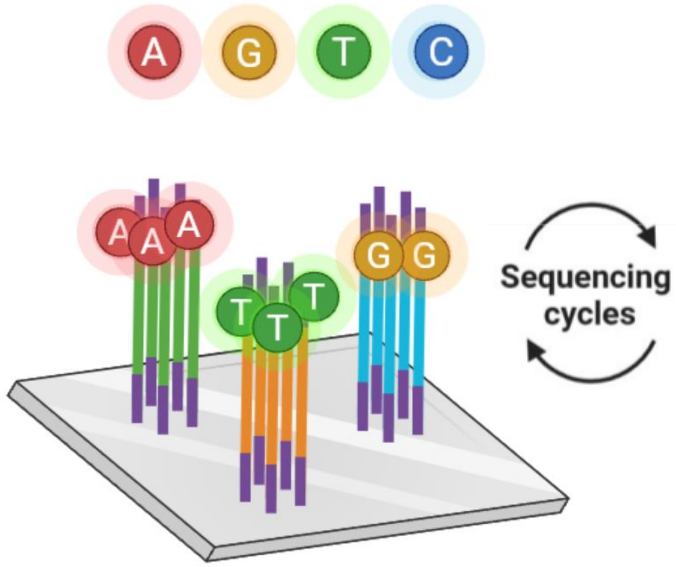


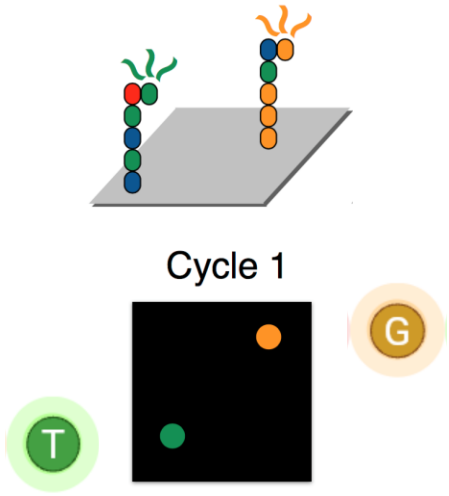
Tecnica: RNA sequencing



5. Sequenziamento da Sintesi (SBS)

Fluorescently labeled nucleotides





Read 1: **T**

Read 2: **G**

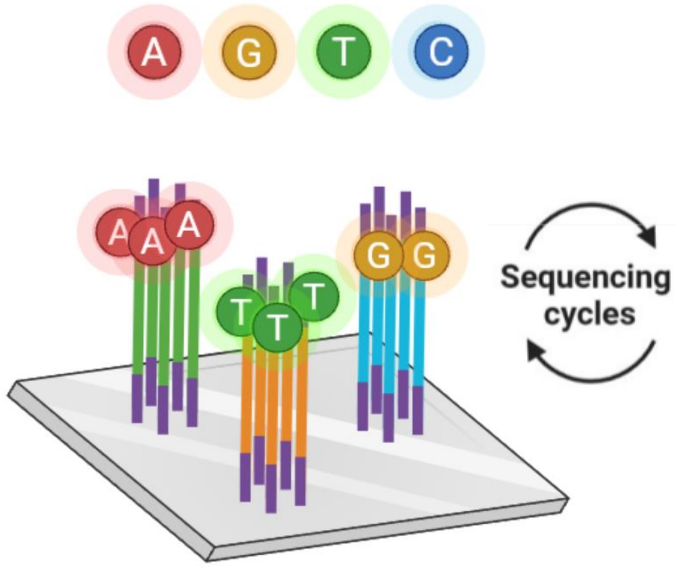
ciclo = 1 nucleotide; 4 canali = 2 bit; il numero di basi lette = il numero di immagini.

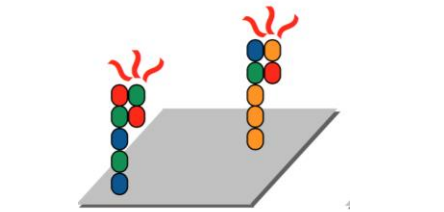
Tecnica: RNA sequencing



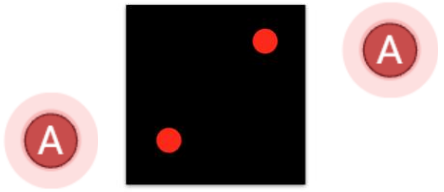
5. Sequenziamento da Sintesi (SBS)

Fluorescently labeled nucleotides





Cycle 2



Read 1: T**A**

Read 2: G**A**

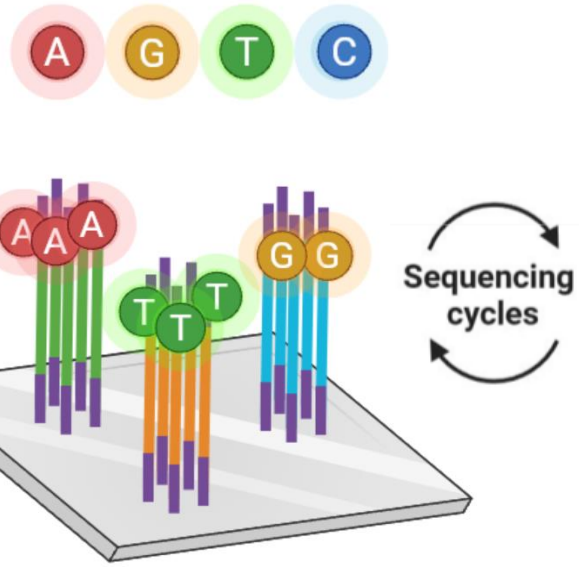
ciclo = 1 nucleotide; 4 canali = 2 bit; il numero di basi lette = il numero di immagini.

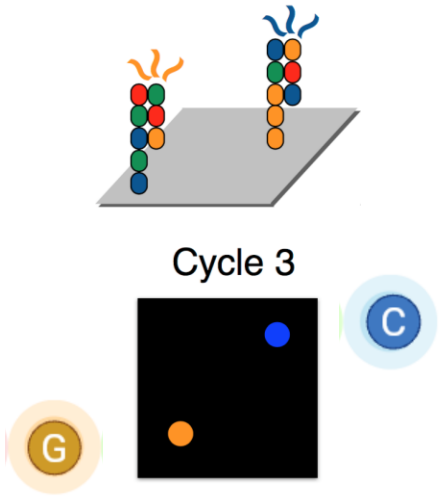
Tecnica: RNA sequencing



5. Sequenziamento da Sintesi (SBS)

Fluorescently labeled nucleotides





Read 1: TA**G**

Read 2: GA**C**

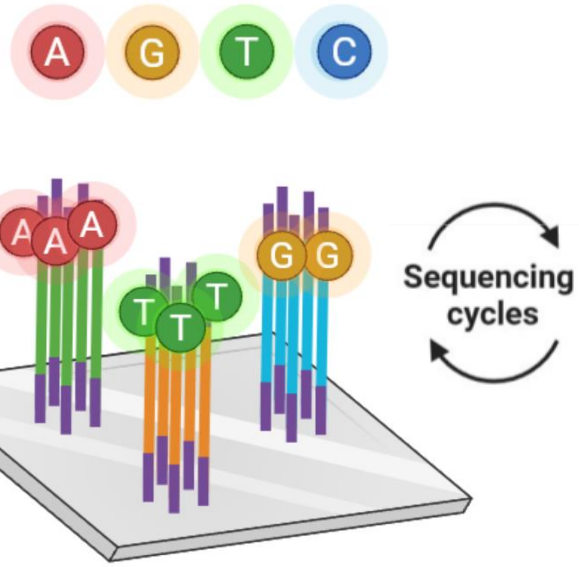
ciclo = 1 nucleotide; 4 canali = 2 bit; il numero di basi lette = il numero di immagini.

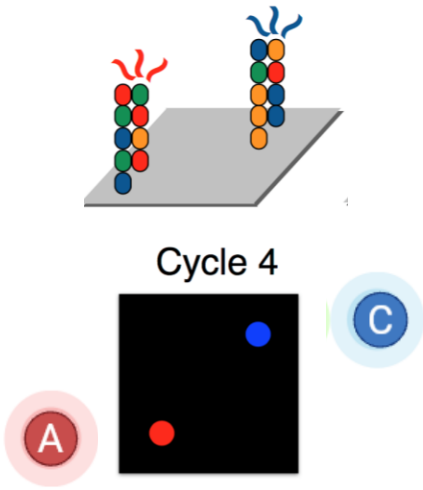
Tecnica: RNA sequencing



5. Sequenziamento da Sintesi (SBS)

Fluorescently labeled nucleotides





Read 1: TAG**A**

Read 2: GAC**C**

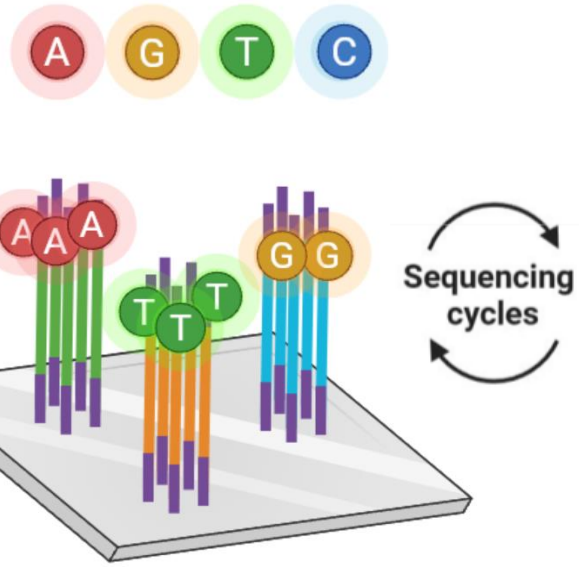
ciclo = 1 nucleotide; 4 canali = 2 bit; il numero di basi lette = il numero di immagini.

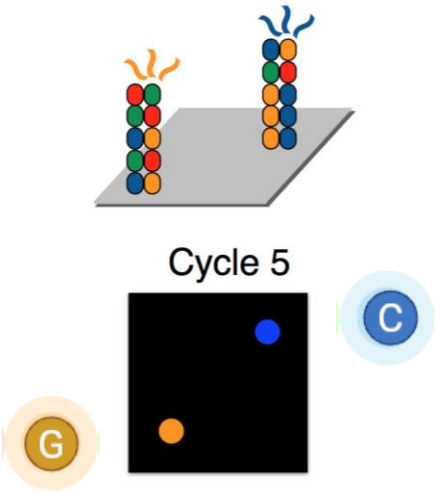
Tecnica: RNA sequencing



5. Sequenziamento da Sintesi (SBS)

Fluorescently labeled nucleotides





Read 1: TAGA**G**

Read 2: GACC**C**

ciclo = 1 nucleotide; 4 canali = 2 bit; il numero di basi lette = il numero di immagini.

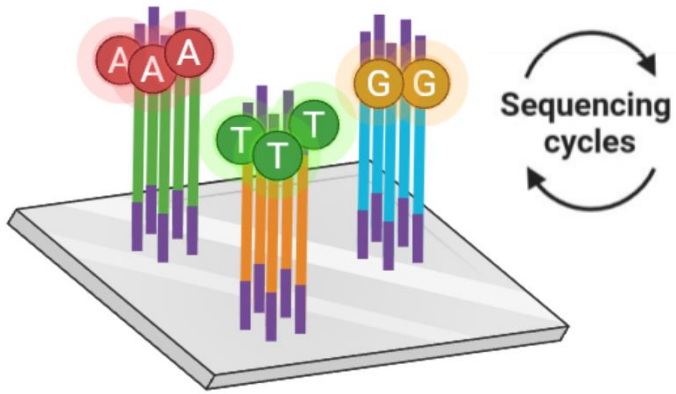
Tecnica: RNA sequencing



5. Sequenziamento da Sintesi (SBS)

Fluorescently labeled nucleotides

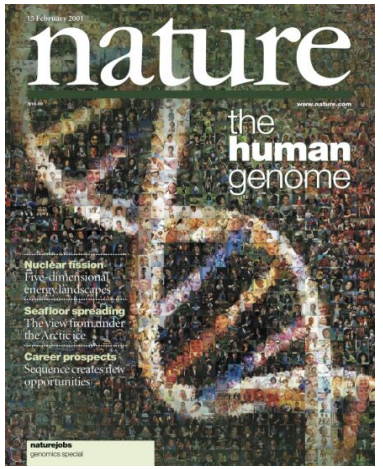






ciclo = 1 nucleotide; 4 canali = 2 bit; il numero di basi lette = il numero di immagini.

Tecnica: RNA sequencing

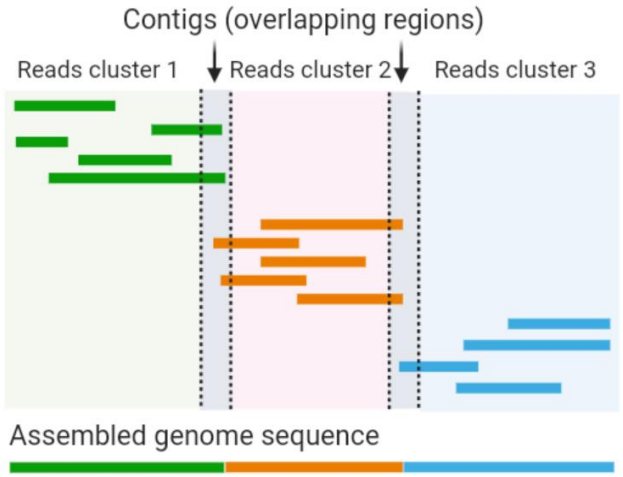


6. Allineamento

10^8–10^9 reads corte → riferimento da 3.1 Gbp

Il dato non è un'intensità: è un **numero di molecole** contate.

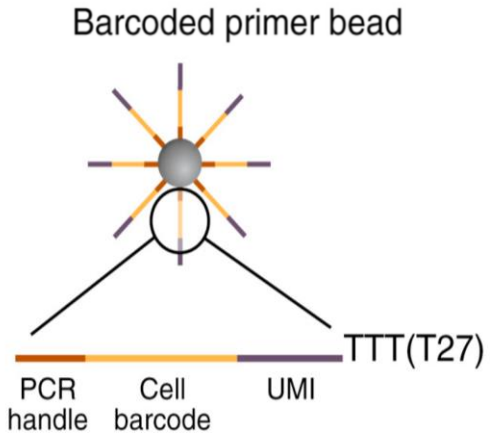
Si contano le reads per gene e si ottiene una **matrice geni × osservazioni**

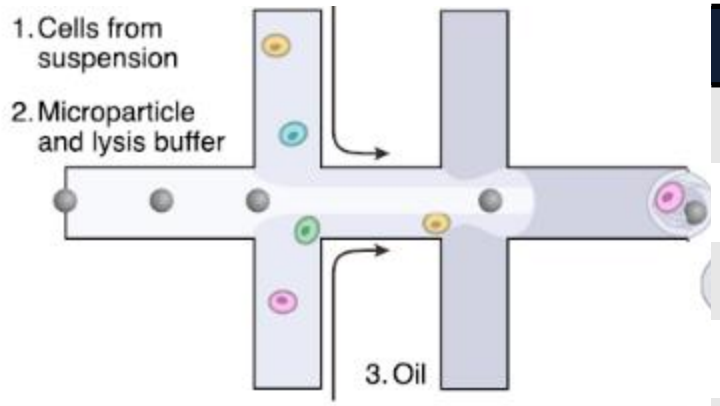


GENES	EXPRESSION
Gene A	0
Gene B	10
Gene C	2
...	...

Single Cell RNA Sequencing (scRNAseq)

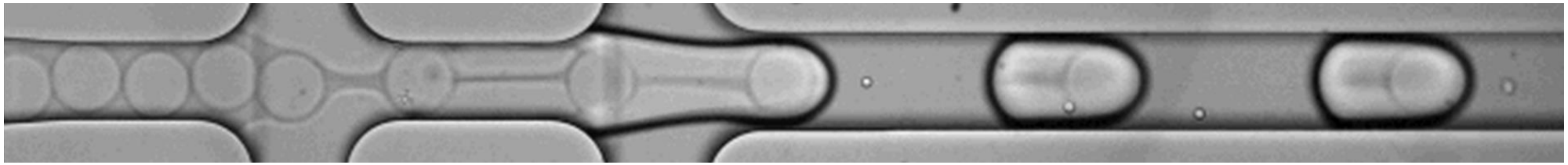
Metodo Drop-seq



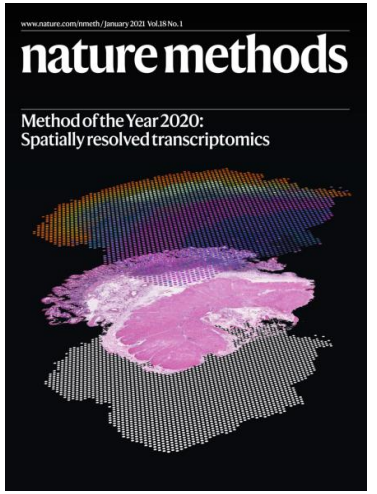


GENES	Cell 1	Cell 2	Cell 3	...	Cell N
Gene A	0	1	4		5
Gene B	10	5	3		0
Gene C	2	10	0		0
.....	...				

Un droplet = una cellula + una sfera di oligo-dT con **barcode cellulare** e **UMI**.
Il **barcode** dice **quale cellula**, l'**UMI** dice quale **molecola**.
~10% contengono una cellula, 10^4–10^5 droplet in poche ore

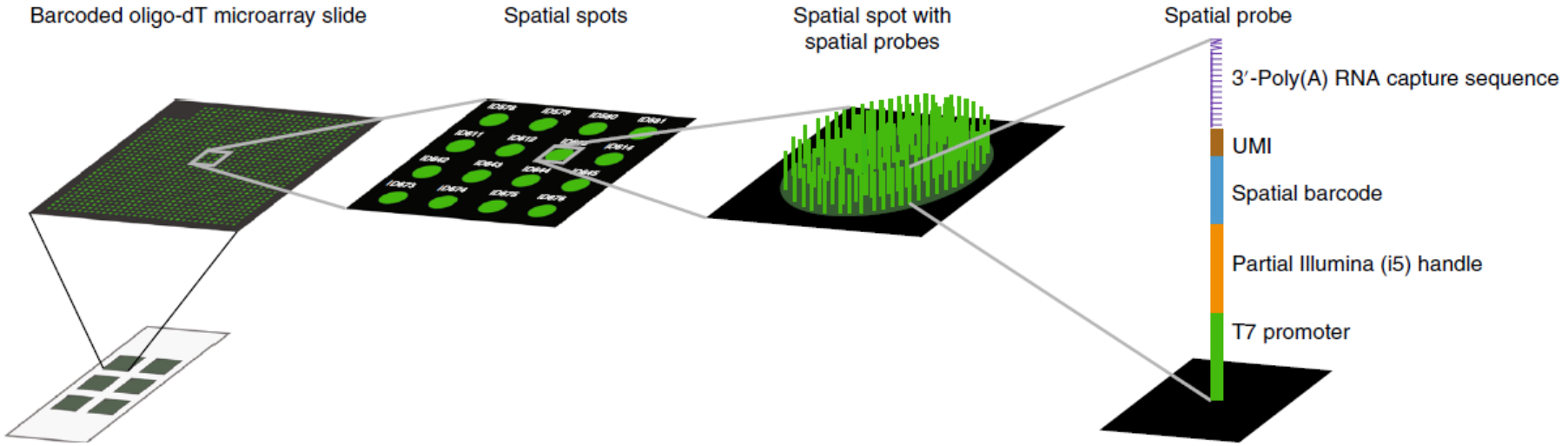


Trascrittomica spaziale



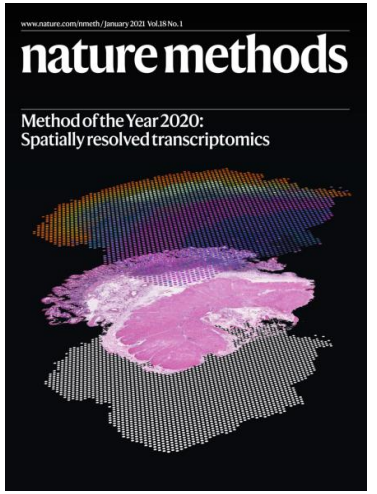
Ståhl *et al. 2016,* Science

1007 spot circolari ognuno con un **barcode spaziale** univoco
mRNAs rilasciati dalle cellule sono catturati localmente in ogni spot
diametro di circa 100 µm, distanza centro centro 200 µm
ogni spot conteneva ~200 milioni di copie della sonda per spot



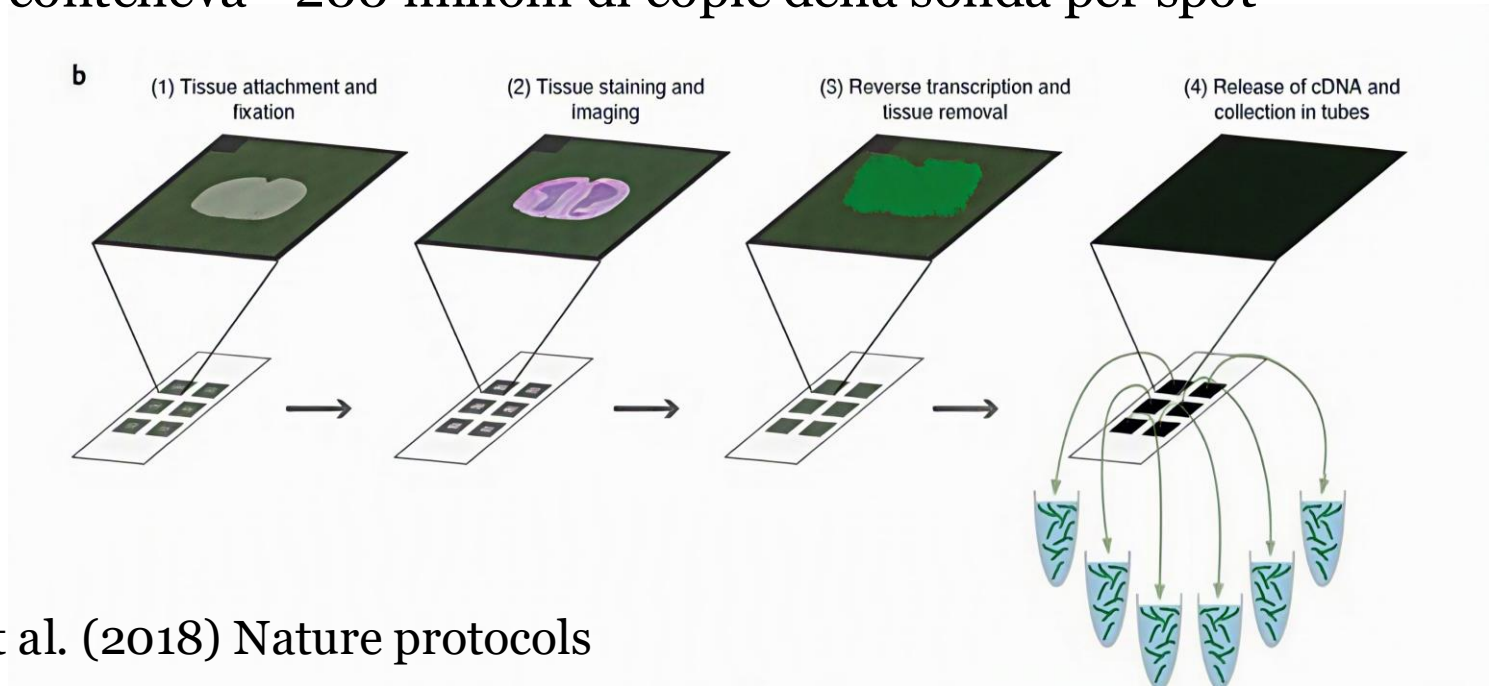
Salmen, Stahl et al. (2018) Nature protocols

Trascrittomica spaziale



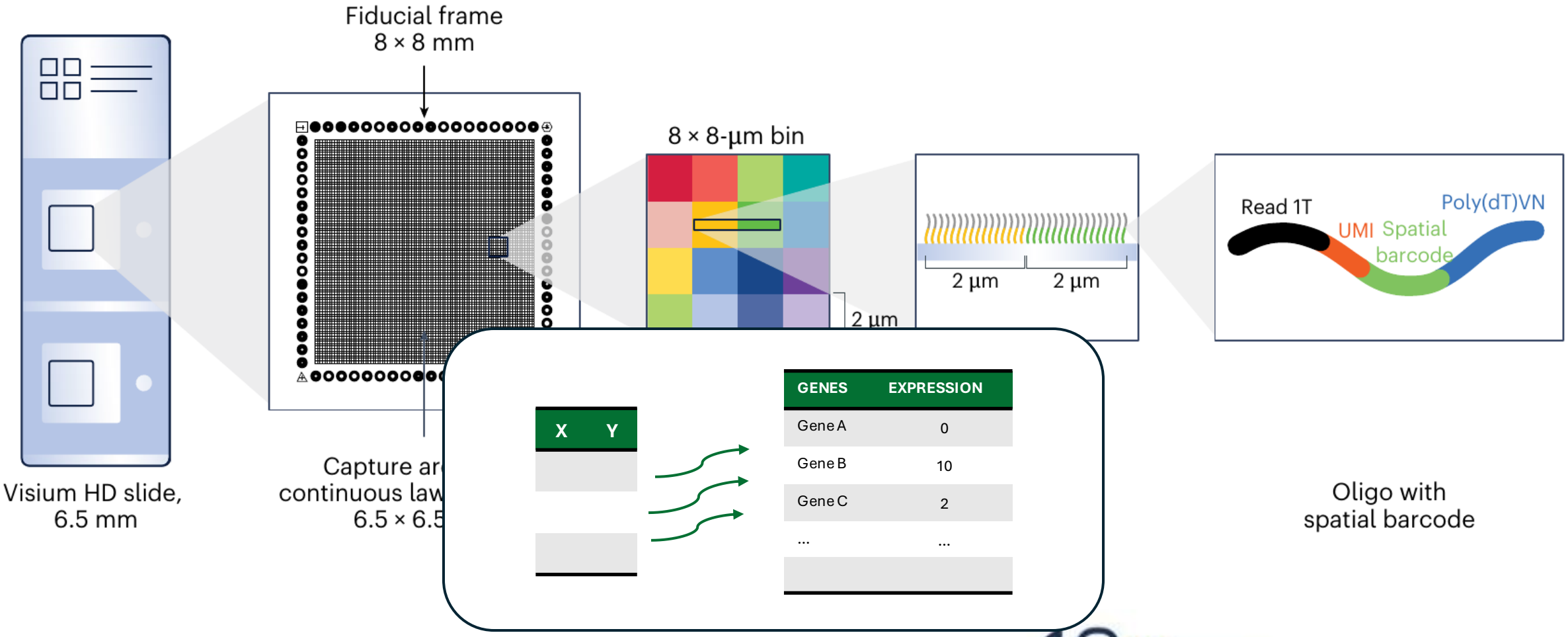
Ståhl *et al. 2016,* Science

1007 spot circolari ognuno con un **barcode spaziale** univoco
mRNAs rilasciati dalle cellule sono catturati localmente in ogni spot
diametro di circa 100 µm, distanza centro centro 200 µm
ogni spot conteneva ~200 milioni di copie della sonda per spot



Salmen, Stahl et al. (2018) Nature protocols

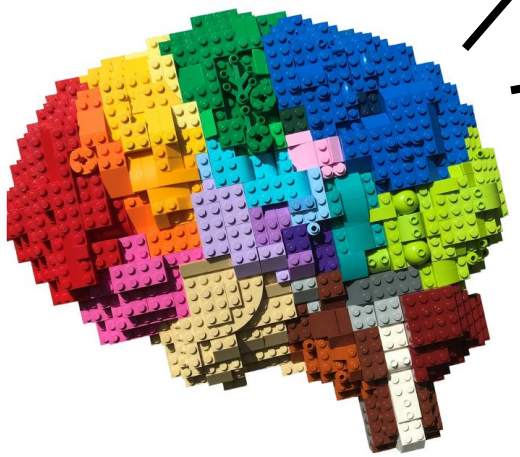
Trascrittomica spaziale: Visium HD



de Oliveira *et al.*, *Nat Genet* 57, 1512–1523 (2025)

10X GENOMICS

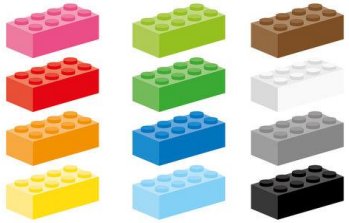
Da Bulk a Spatial





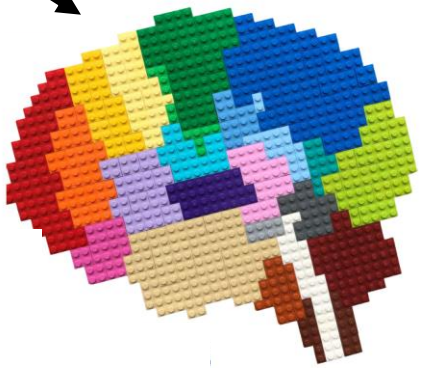
Bulk RNAseq

GENES	EXPRESSION
Gene A	0
Gene B	10
Gene C	2
...	...



scRNAseq

GENES	Cell 1	Cell 2	Cell 3	...	Cell N
Gene A	0	1	4		5
Gene B	10	5	3		0
Gene C	2	10	0		0
.....	...				



Spatial RNAseq

X	Y

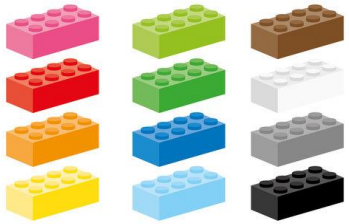
GENES	EXPRESSION
Gene A	0
Gene B	10
Gene C	2
...	...

Tecniche di sequenziamento a confronto

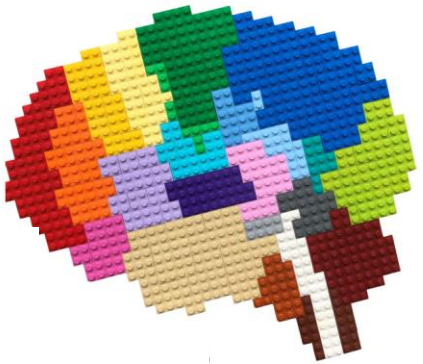
- **Bulk RNA seq**: espressione media dei livelli di RNA in ogni campione
  - Trascrittomica comparativa
  - Biomarker di patologie
  - Alta profondità di sequenziamento
  - Basso costo (100€/sample con 20M reads/sample)



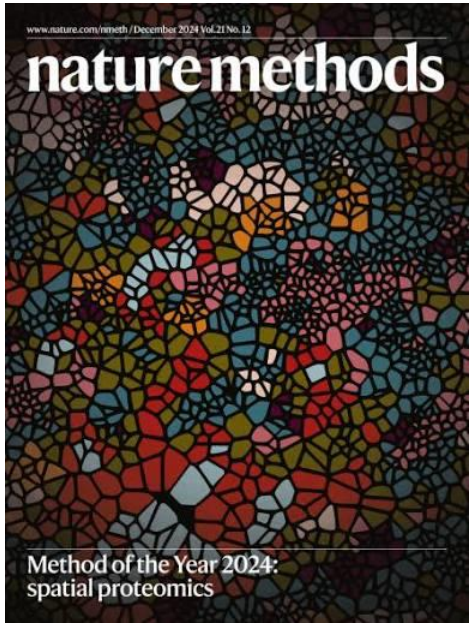
- **scRNA seq**: discrimina e identifica sottopopolazione intracampione
  - Eterogeneità
  - Identificare popolazioni rare
  - Identificare dinamica di popolazioni cellulari
  - Aumentano i costi (2000€/sample)



- **RNAseq spaziale:**
  - Identifica firme locali e sistemiche nella risposta di patologie
  - Perdita di profondità di sequenziamento
  - Informazione spaziale 2D
  - Molto costosa (5000-10000€/sample)



Proteomica spaziale

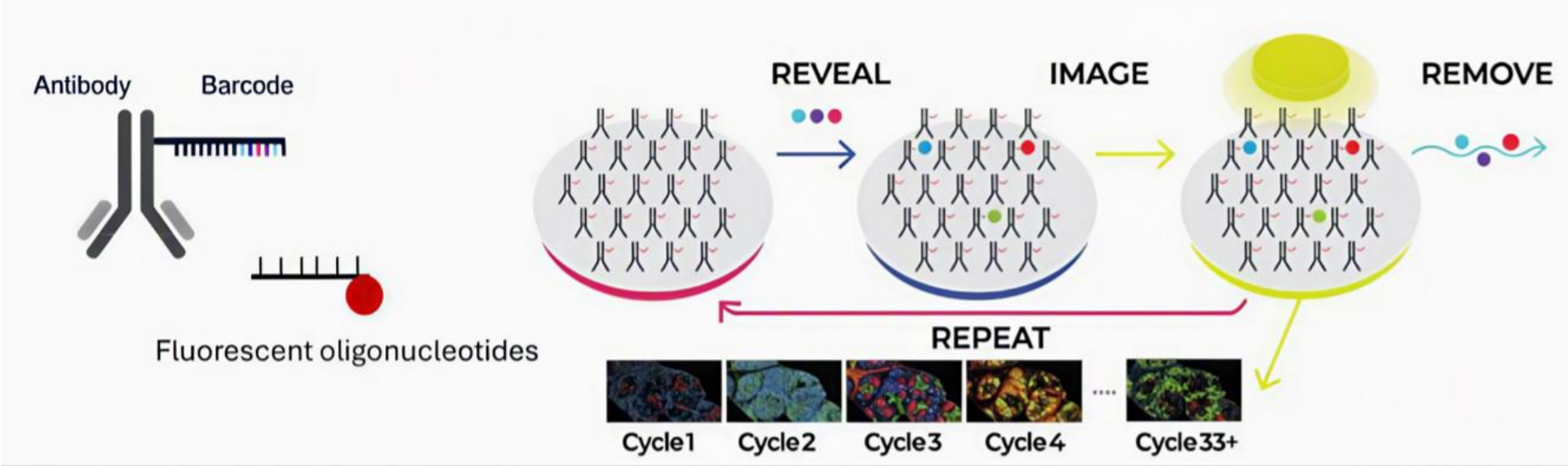


2 famiglie di tecnologie:

- *Imaging Mass Spectrometry (untargeted)* — ablazione laser, senza anticorpi, ~10–50 µm, misura lipidi/metaboliti/peptidi

- ***Cycling fluorescent imaging (targeted)*** — anticorpo coniugato a un oligo-barcode; il codice è **nel tempo (round) × nel colore (canale)**. Nessuna amplificazione: il segnale è **analogico**, non un conteggio.

Proteomica spaziale: Cycling Fluorescent Imaging





Cocktail unico: tutti gli anticorpi insieme, ognuno coniugato a un **oligo-barcode** di DNA. Un solo passaggio di incubazione, indipendentemente dal pannello.
100+ proteine, **solo 4 colori.** Senza codice temporale il multiplexing massimo sarebbe 4.

Ciclo (~25 min): miscela di oligo di rivelazione fluorescenti → ibridazione sui barcode → imaging → **deibridazione** → ciclo successivo.

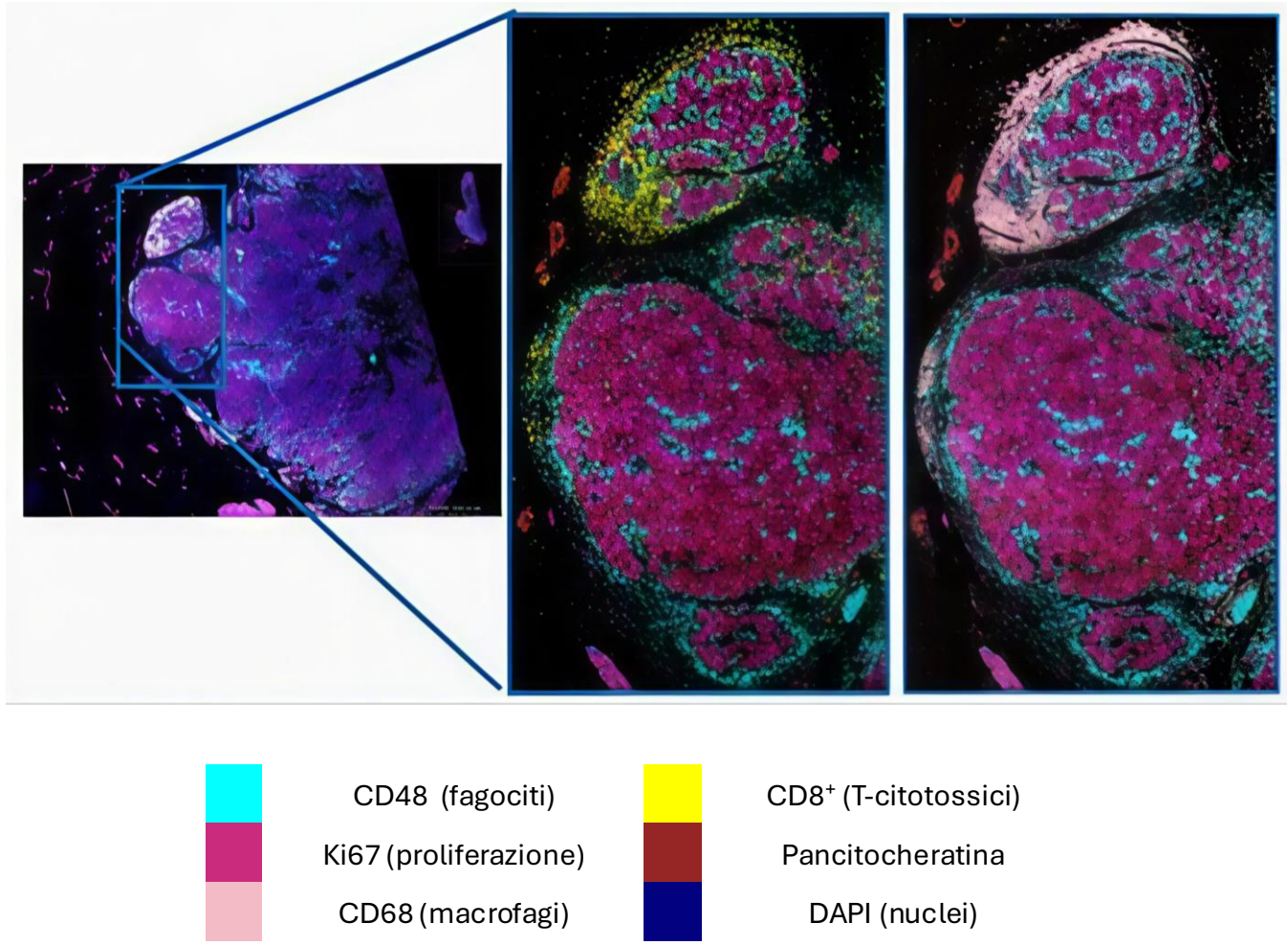
Codice: ogni marcatore ha un barcode su **round × canale** (3–4 canali utili + DAPI).

Proteomica spaziale: Cycling Fluorescent Imaging

Prestazioni: 0,5 µm/px a 20×;
100+ marcatori validati;
FFPE e fresh frozen;
~1 cm^2 in 12–24 h; ~1 vetrino/giorno.

Segnale: fluorescenza **analogica**, senza amplificazione
La sensibilità è limitata dall'**affinità dell'anticorpo**.

La deriva termica e meccanica accumulata su 40–60 cicli è il vero limite tecnico, non l'ottica.



Targeted vs Untargeted
Imaging vs Sequencing

Come imaging *in situ* in proteomica, si può fare imaging di trascrittomica.

	Imaging	**Sequencing**
Targeted	Xenium, CosMx, MERSCOPE, PhenoCycler	GeoMx DSP
Untargeted	IMS / MALDI	Visium, Visium HD, Stereo-seq

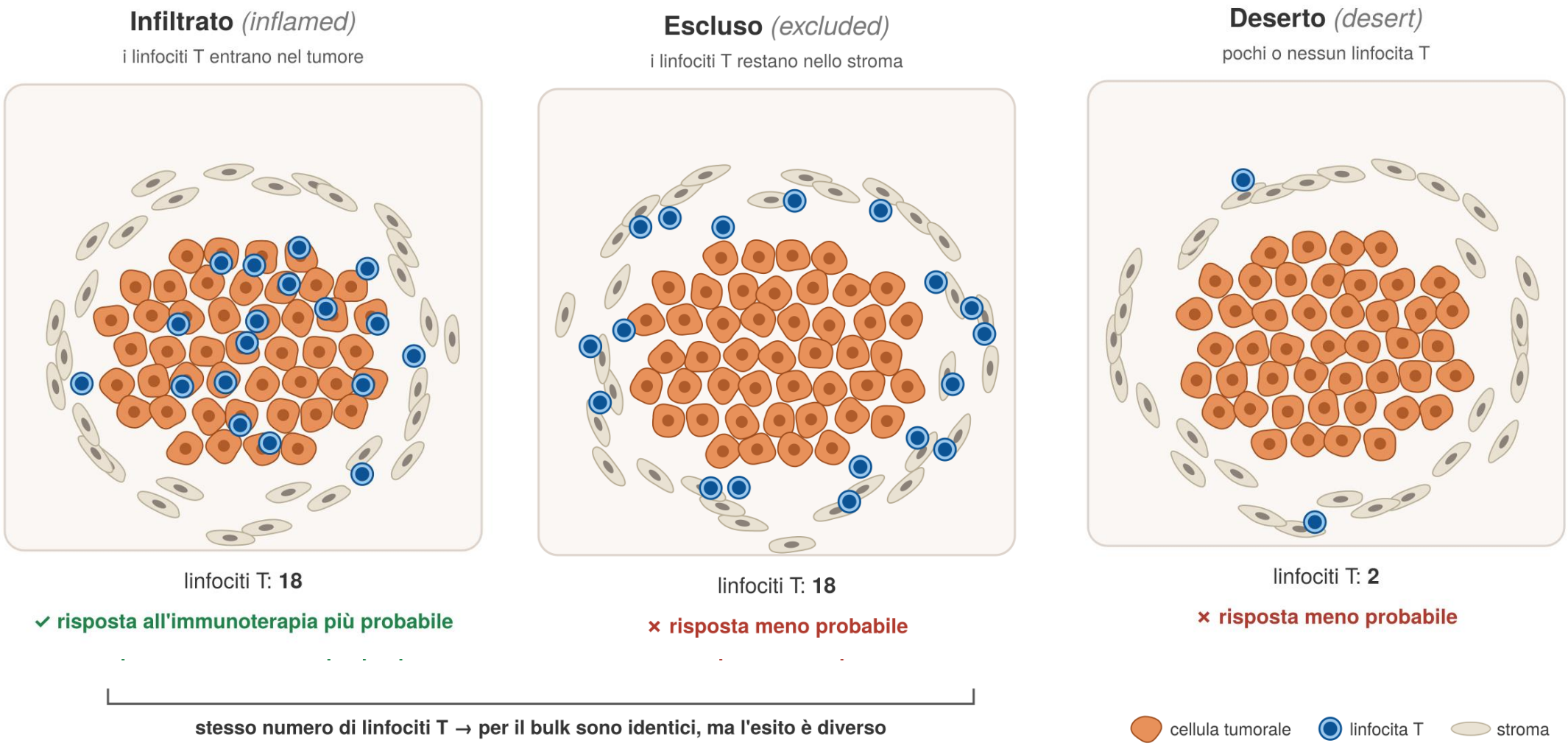
illumina® 10x GENOMICS® BRUKER Akoya VIZgen® Standard BioTools

Spatial RNA Technologies comparison

	IMAGING BASED 	 SEQUENCING BASED
Trascritti per unità di area	risoluzione subcellulare (0,2 µm), conta singole molecole	trascrittoma intero, costo per area basso
Trascritti per unità di area	~10^2–10^3 molecole/cellula	~10^3–10^4 UMI per spot da 55 µm, ÷50 a 8 µm
Geni	pannello a priori, 300–6 000	intero trascrittoma
Tempo strumento	1–3 giorni di imaging	1 giorno di library + corsa NGS
Costo	strumento o servizio, 1–3 gg	library + NGS, 1 gg + corsa
Debolezza	crowding ottico, devi sapere cosa cerchi	profondità per bin (÷47, ÷756)

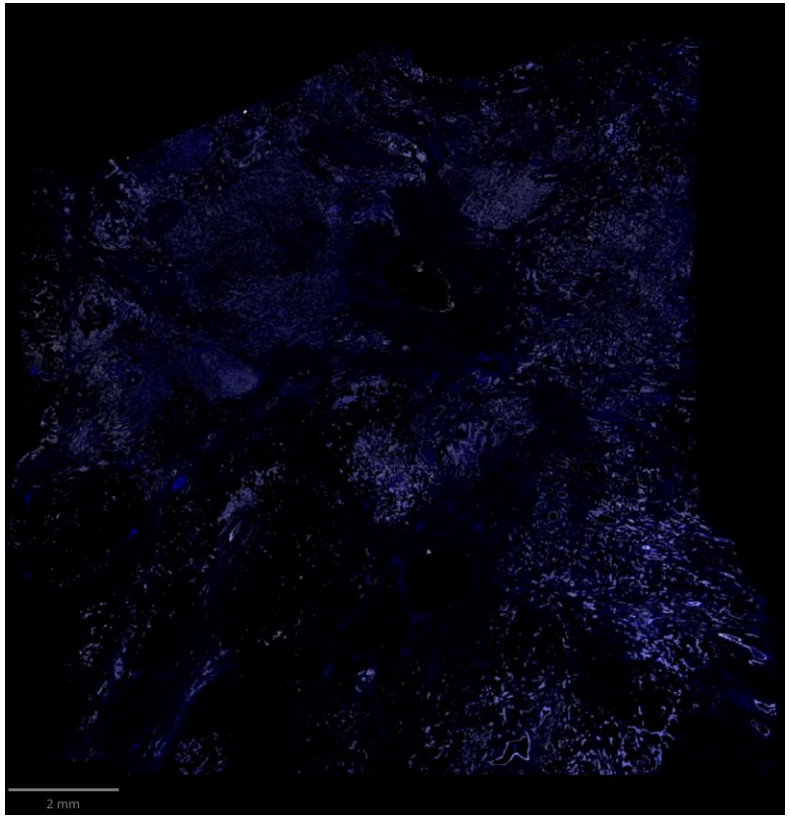
Multi-omiche spaziali per la medicina personalizzata

Perché lo spazio conta?

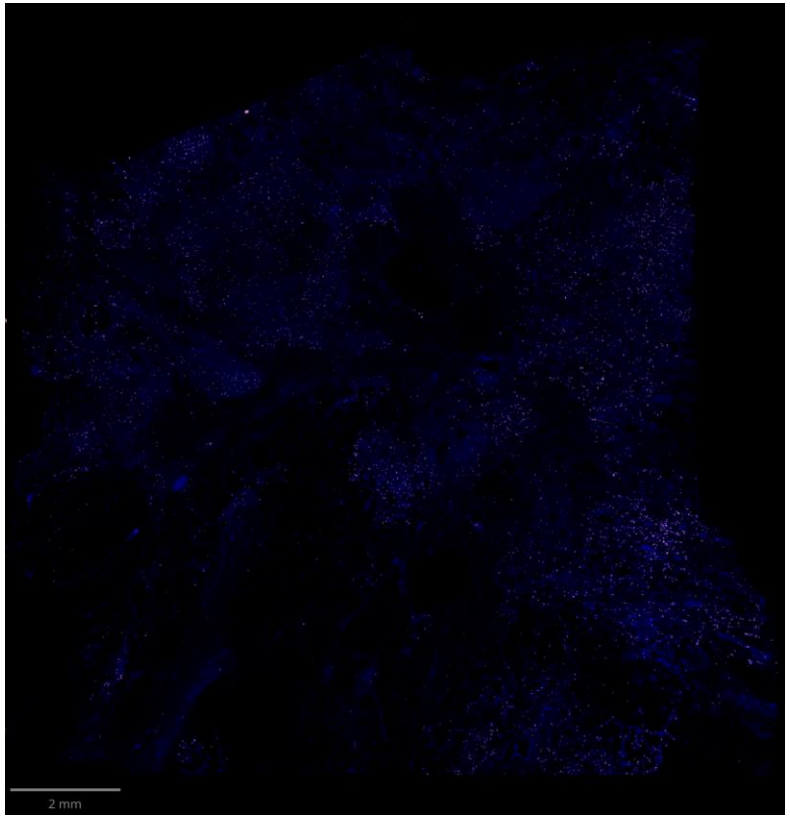


Come analizziamo i dati multi-omici spaziali?

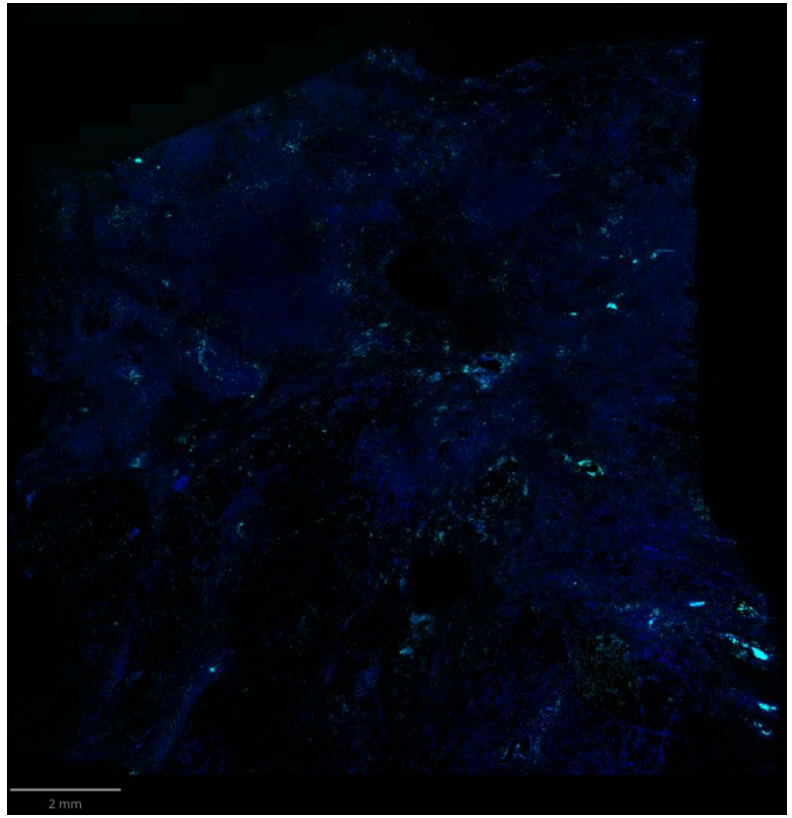
Metodi basati su imaging (microscopia)



DAPI + Granzima B



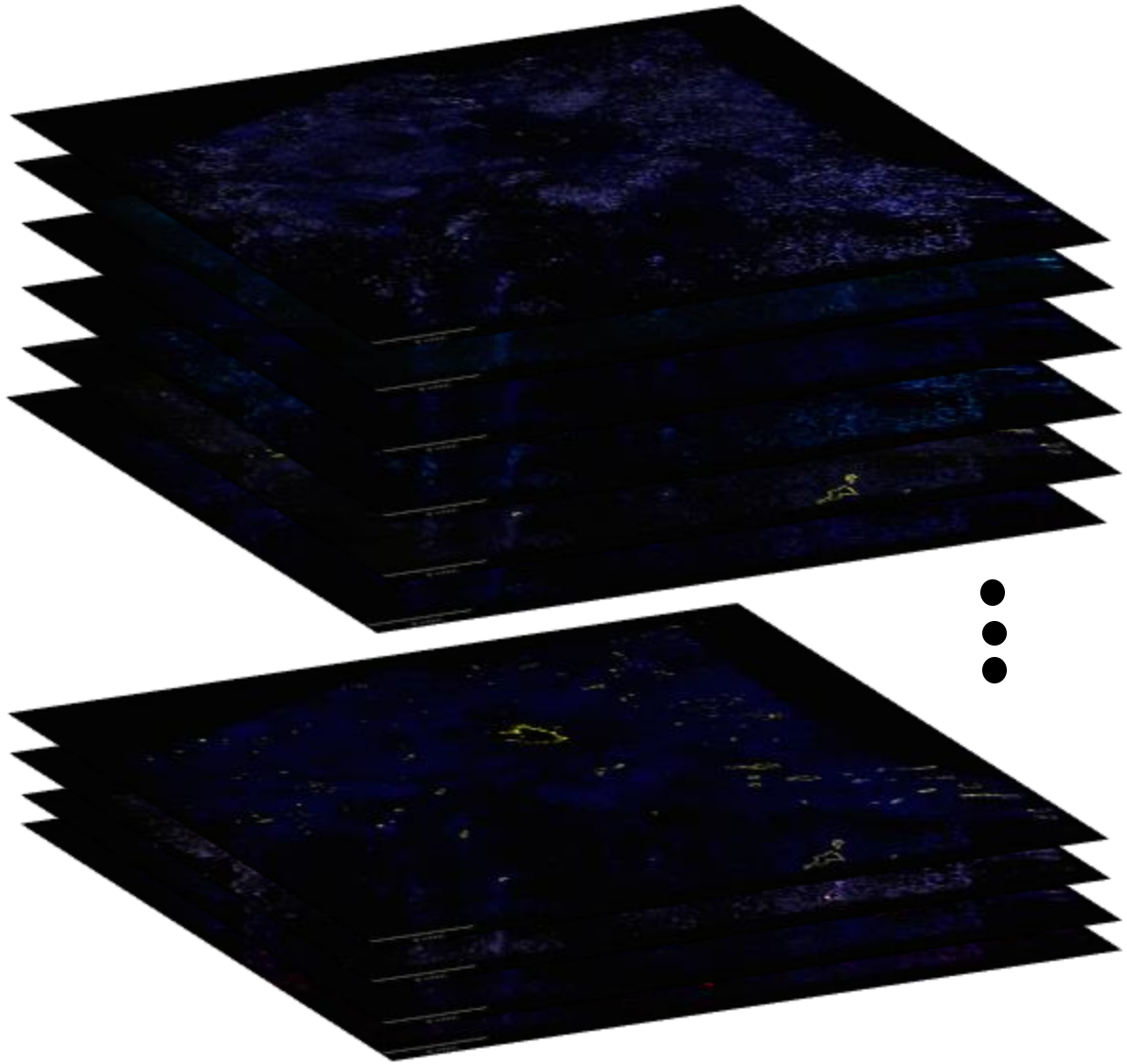
DAPI + Ki67



DAPI + CD68

Come analizziamo i dati multi-omici spaziali?

Metodi basati su imaging (microscopia)



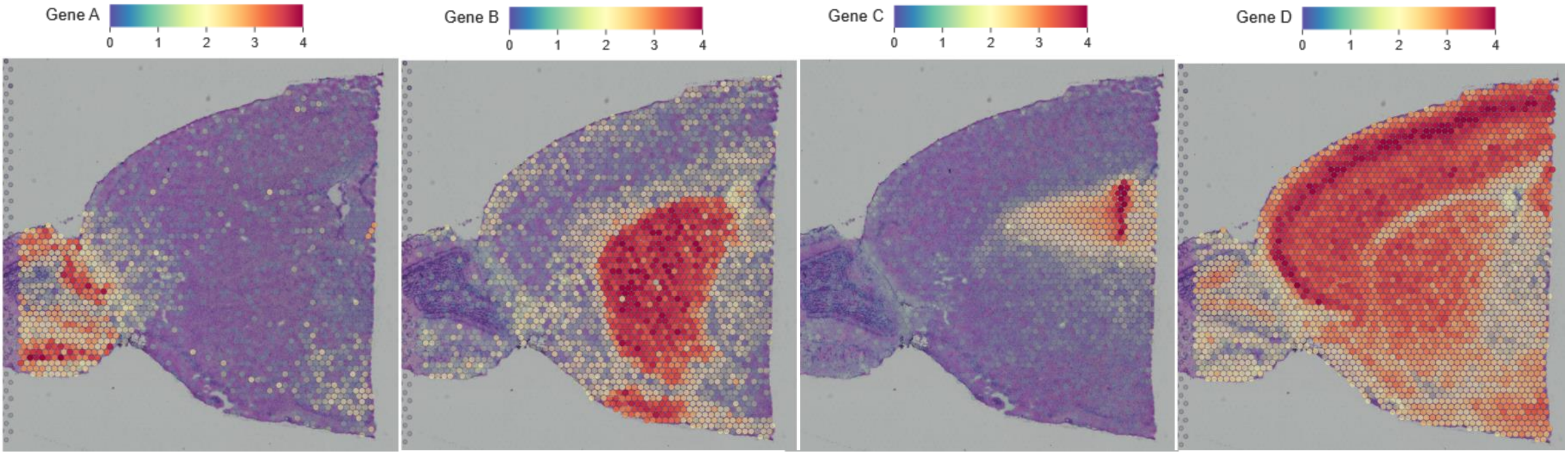
Dati ad alta dimensionalità

Fino a 100 canali per la proteomica (Akoya)
Fino a 10000 canali per la trascrittomica (CosMx,Xenium)

In ogni pixel abbiamo un segnale proporzionale al livello di espressione della proteina/RNA presente

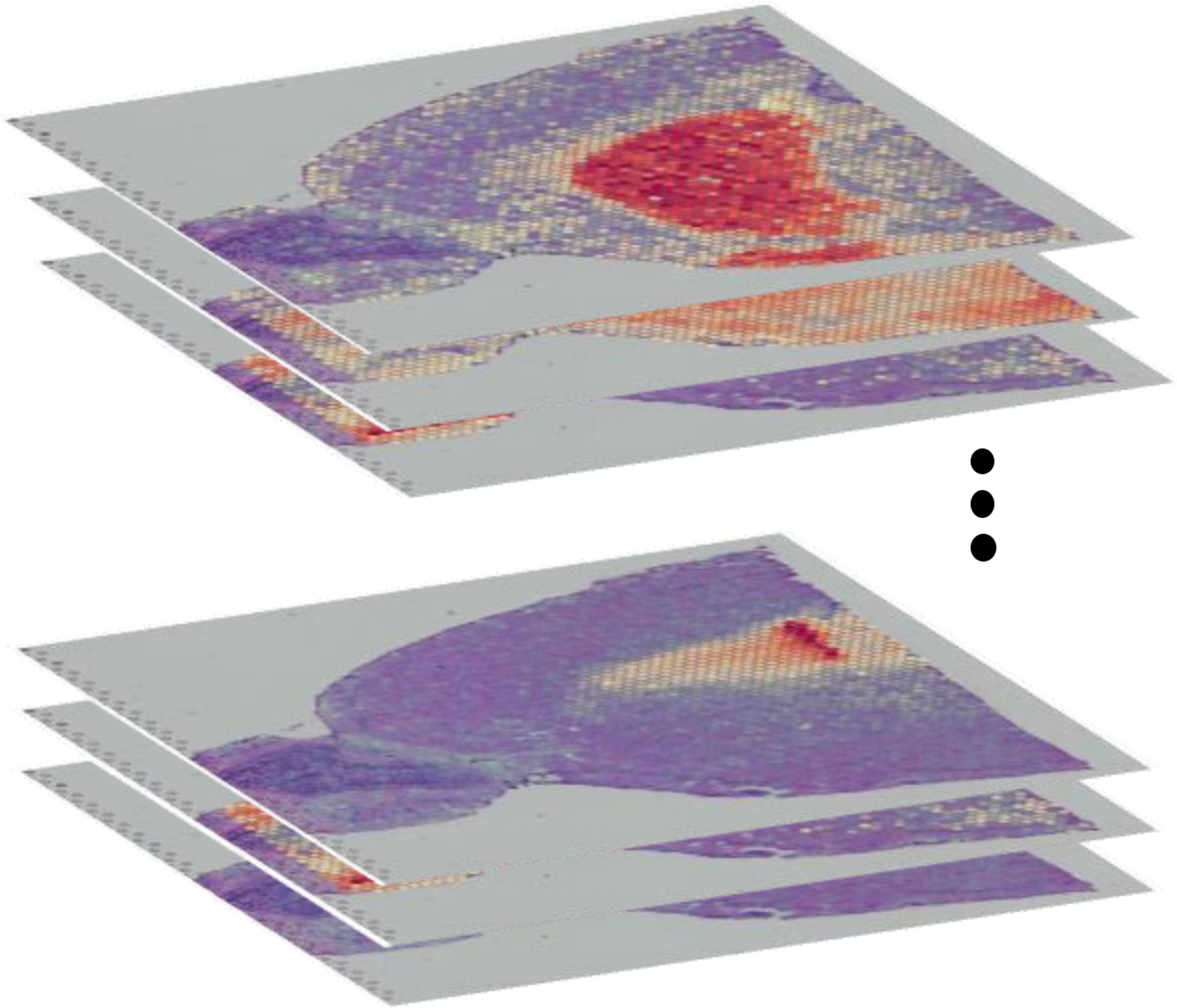
Come analizziamo i dati multi-omici spaziali?

Metodi basati su sequenziamento



Come analizziamo i dati multi-omici spaziali?

Metodi basati su sequenziamento



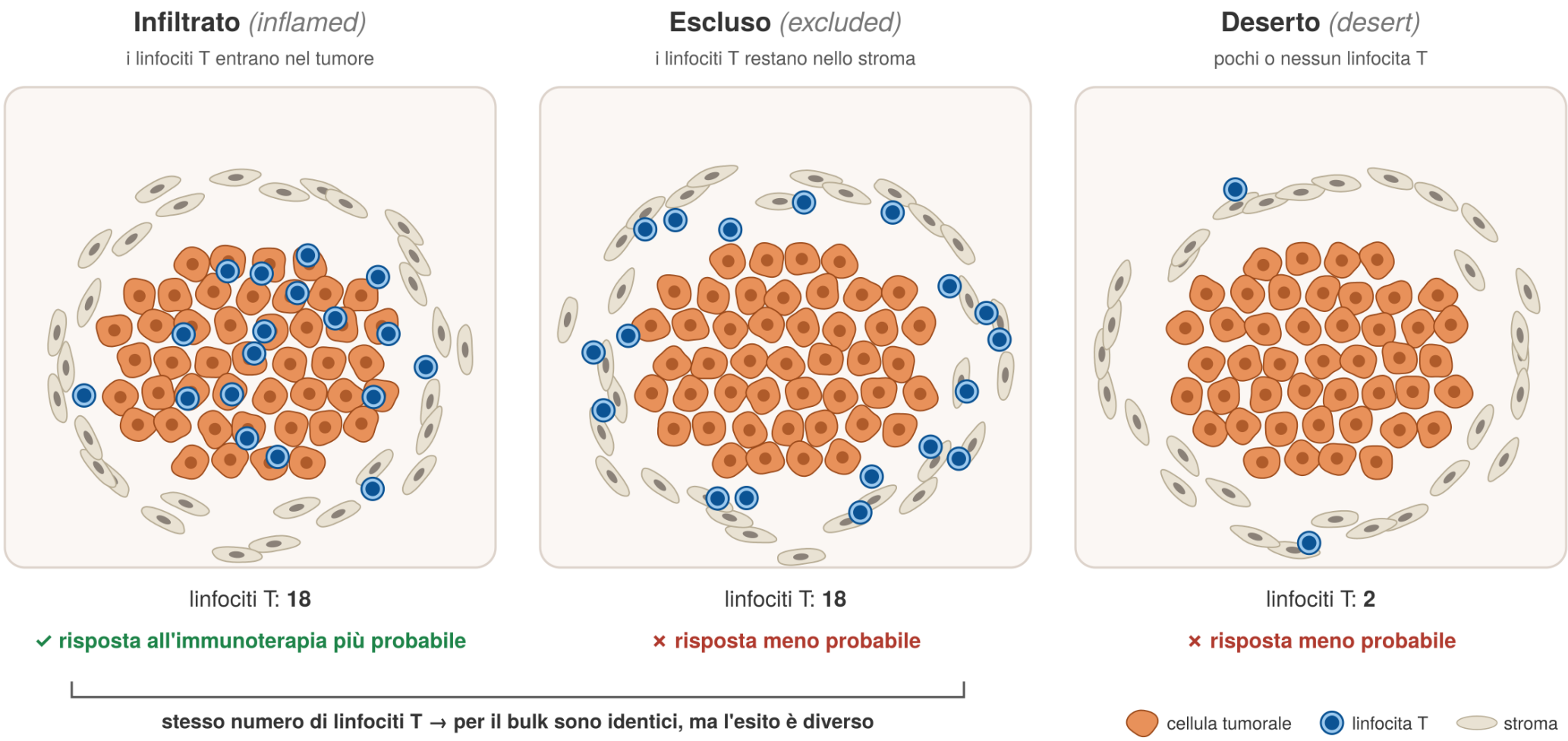
Dati ad alta dimensionalità

Fino a 20000 trascritti (canali) per VISIUM HD

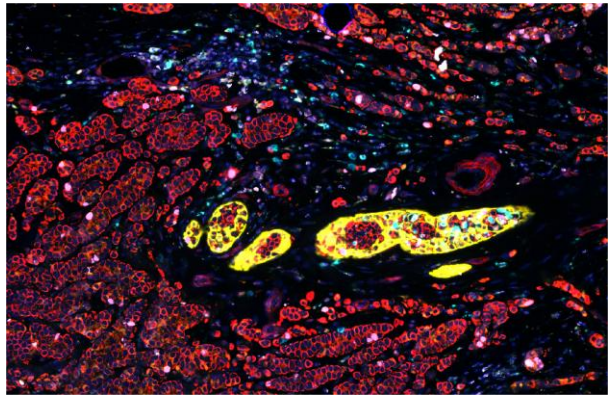
In ogni spot abbiamo un conteggio delle molecole di RNA presente

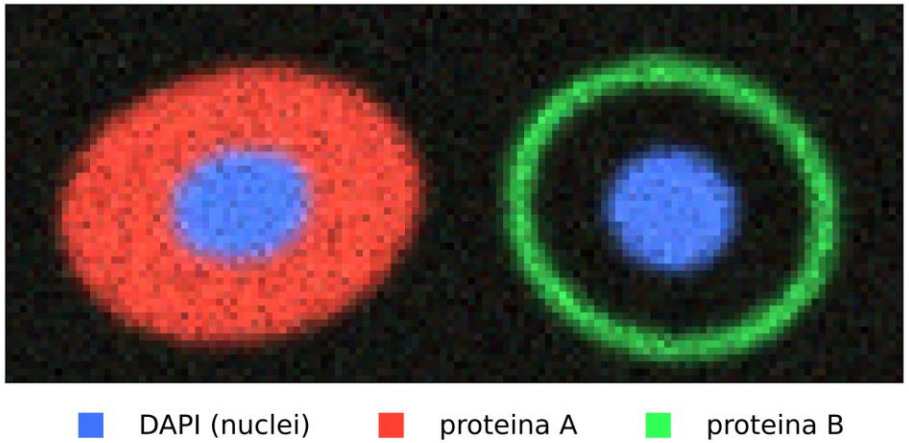
Multi-omiche spaziali per la medicina personalizzata

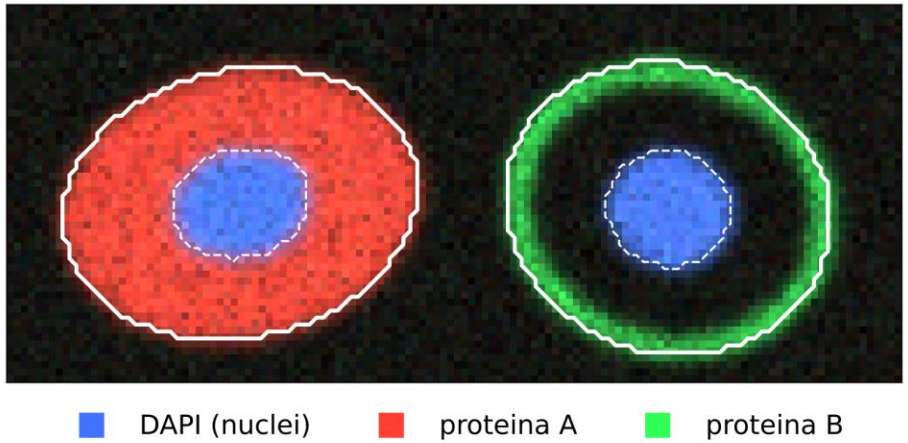
Perché lo spazio conta?

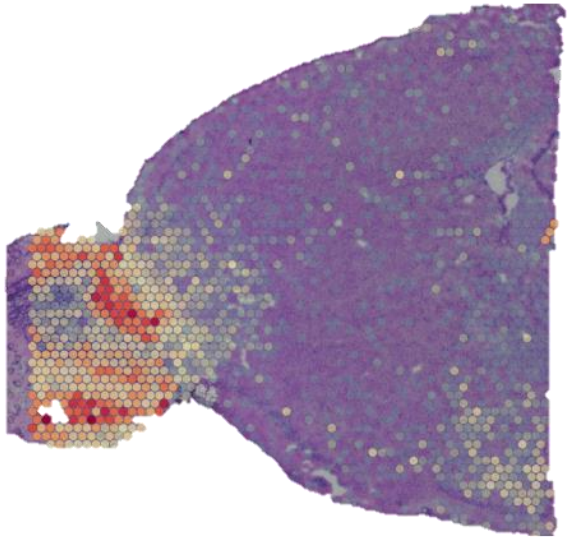


Dalle immagini alle singole cellule

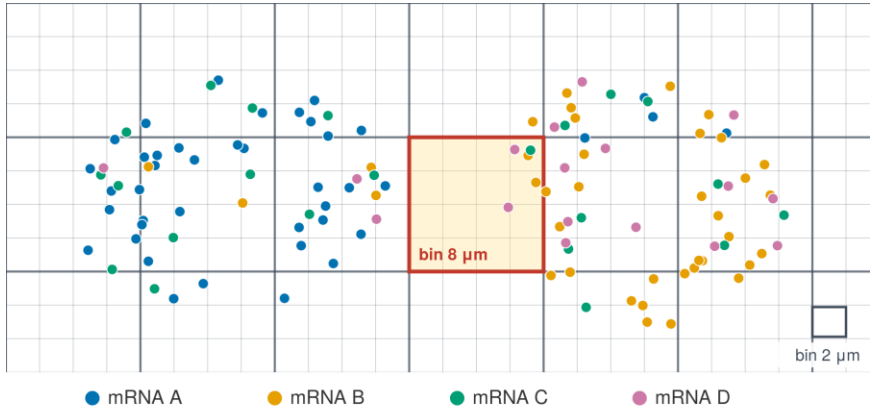


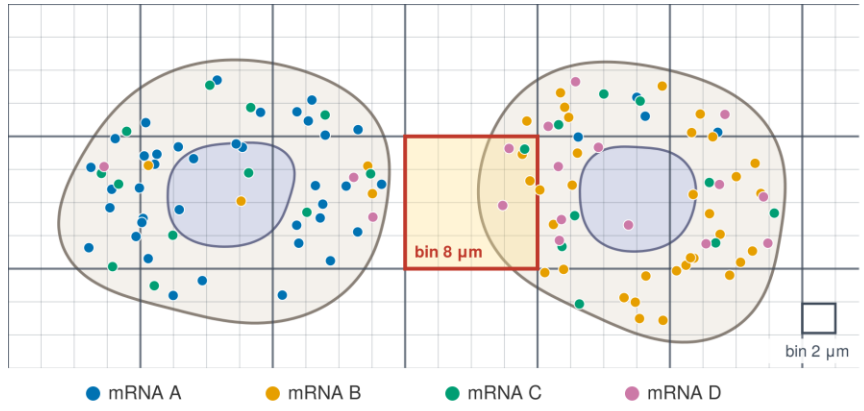






Segmentazione dei nuclei

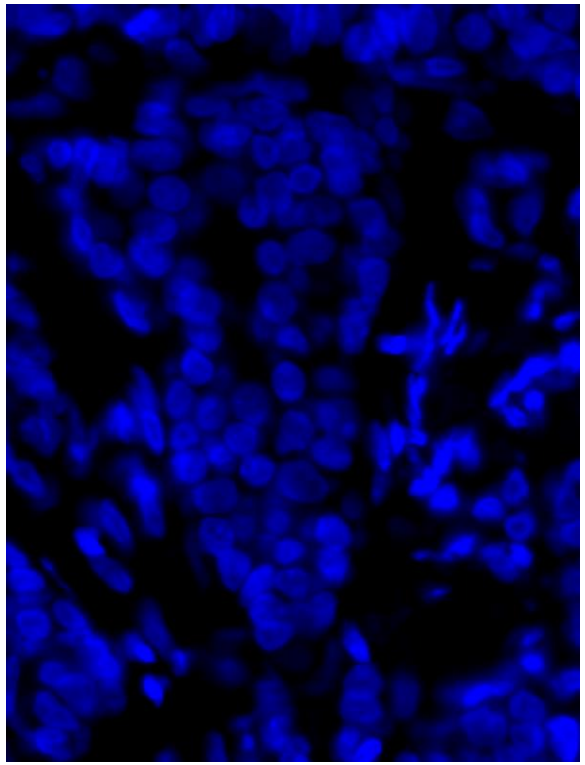




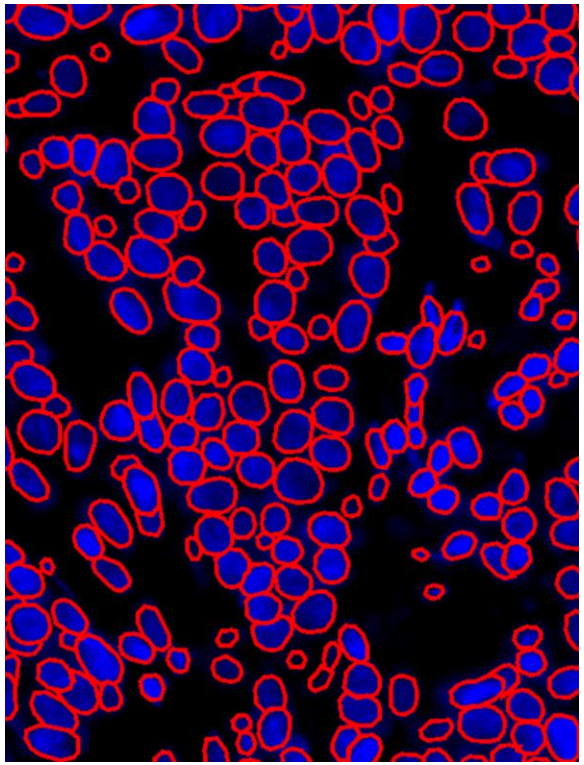
Dalle immagini alle singole cellule



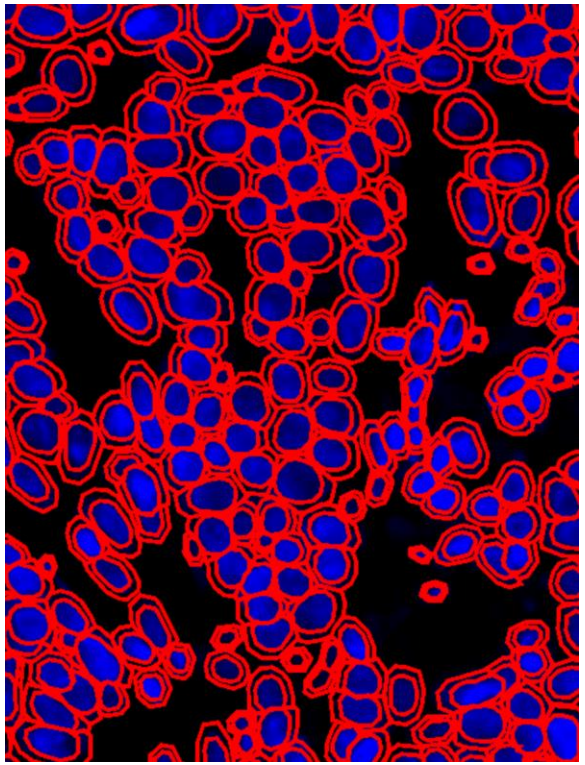
Dalle immagini alle singole cellule



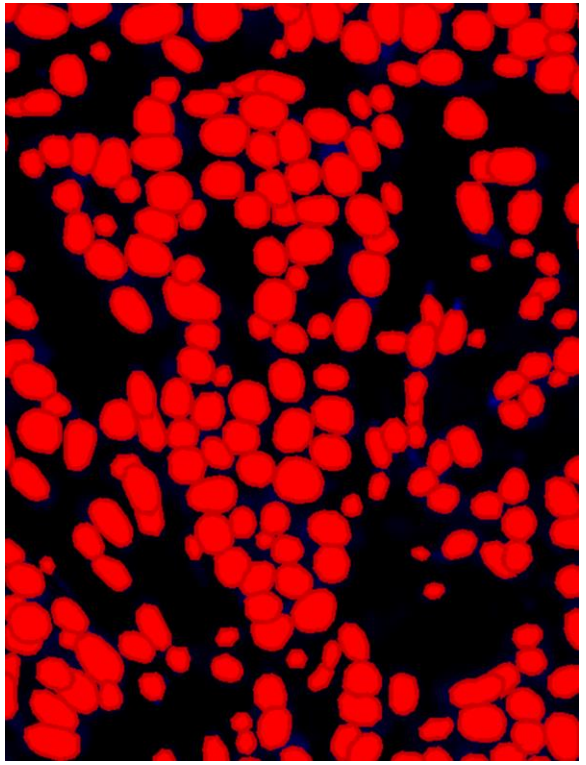
Il DAPI è un colorante fluorescente che lega regioni del DNA ricche in sequenze A-T



Segmentazione dei nuclei sul canale del DAPI



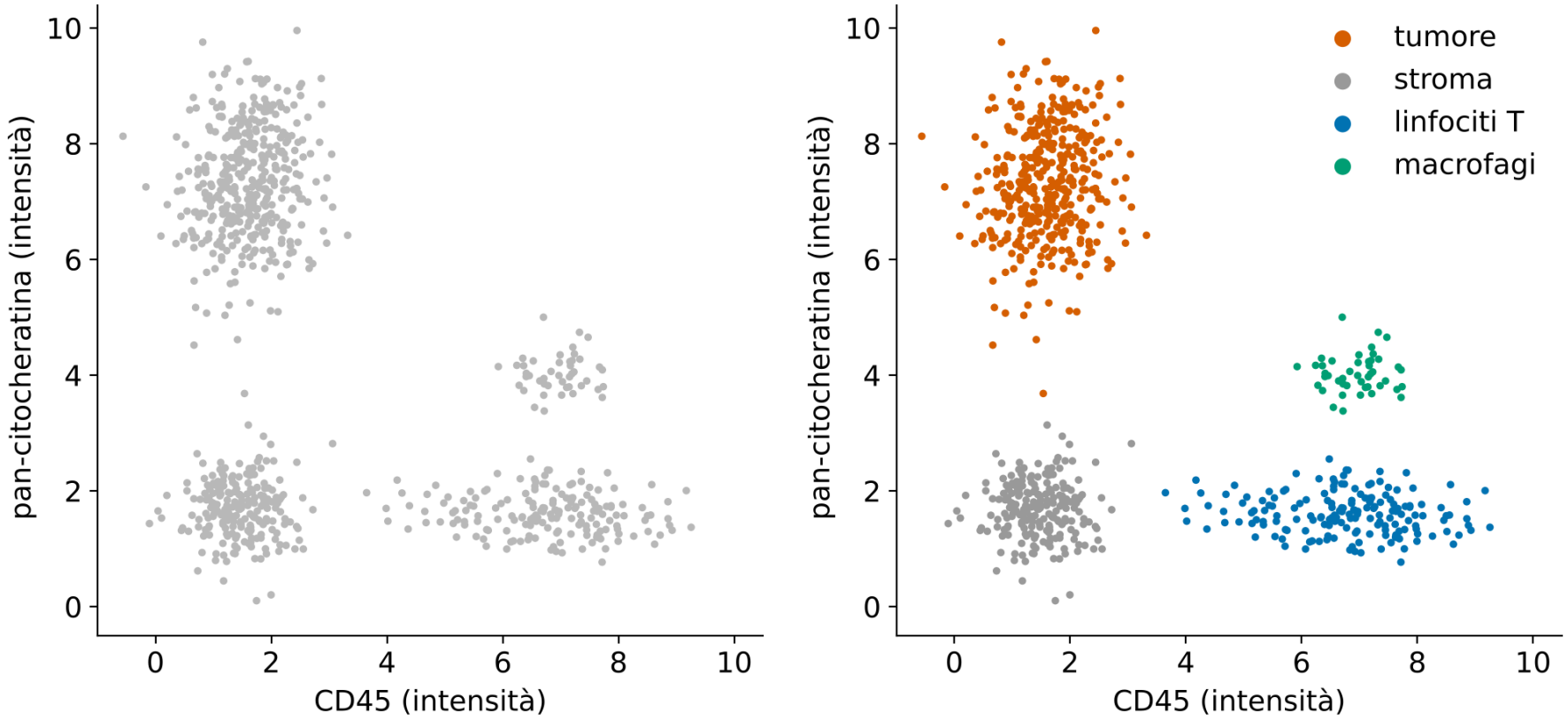
Segmentazione della cellula tramite espansione del nucleo



Maschera finale

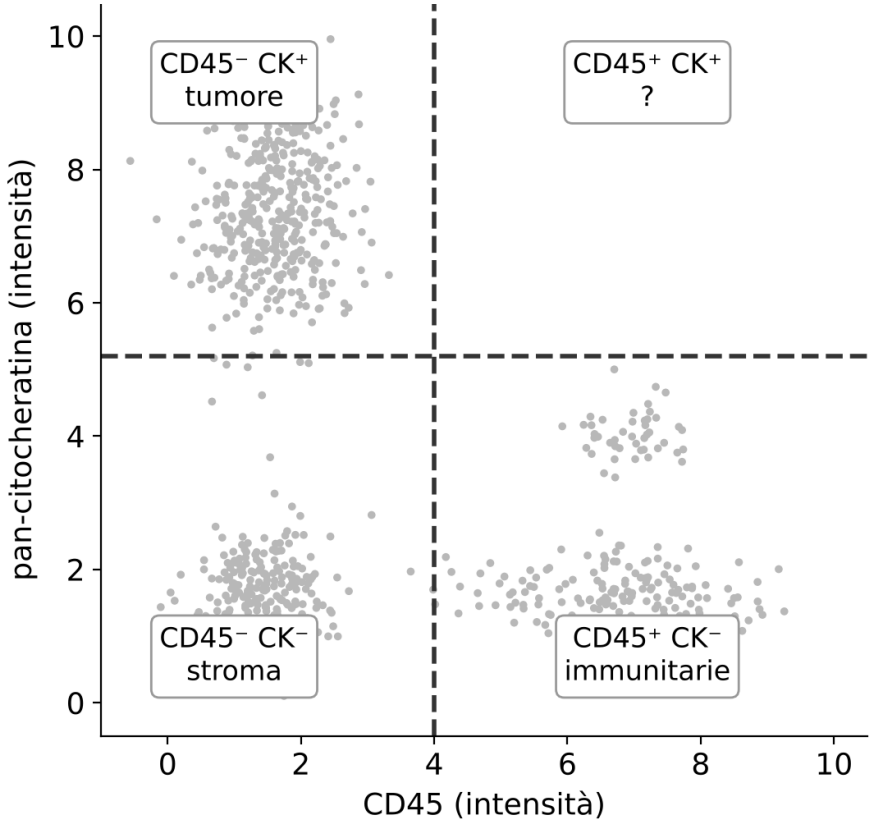
Classificazione delle cellule

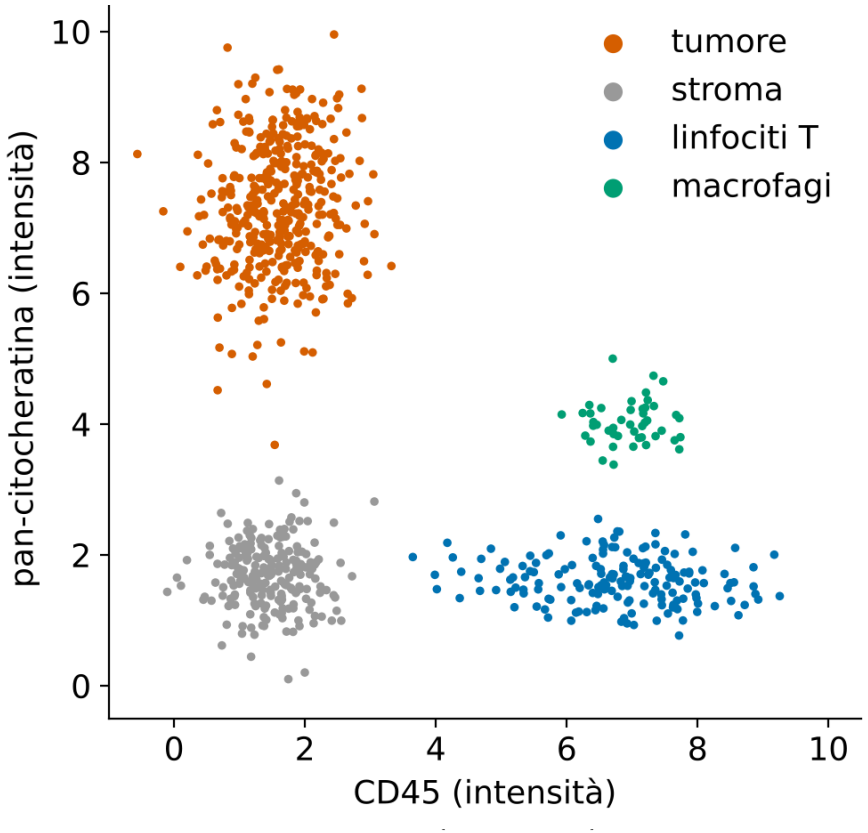
Quali geni/proteine sono espressi post trattamento nelle cellulare tumorali?
Alcuni tipi cellulari sono più o meno abbondanti in una condizione rispetto a un'altra?



Classificazione delle cellule

Quali geni/proteine sono espressi post trattamento nelle cellulare tumorali?
Alcuni tipi cellulari sono più o meno abbondanti in una condizione rispetto a un'altra?



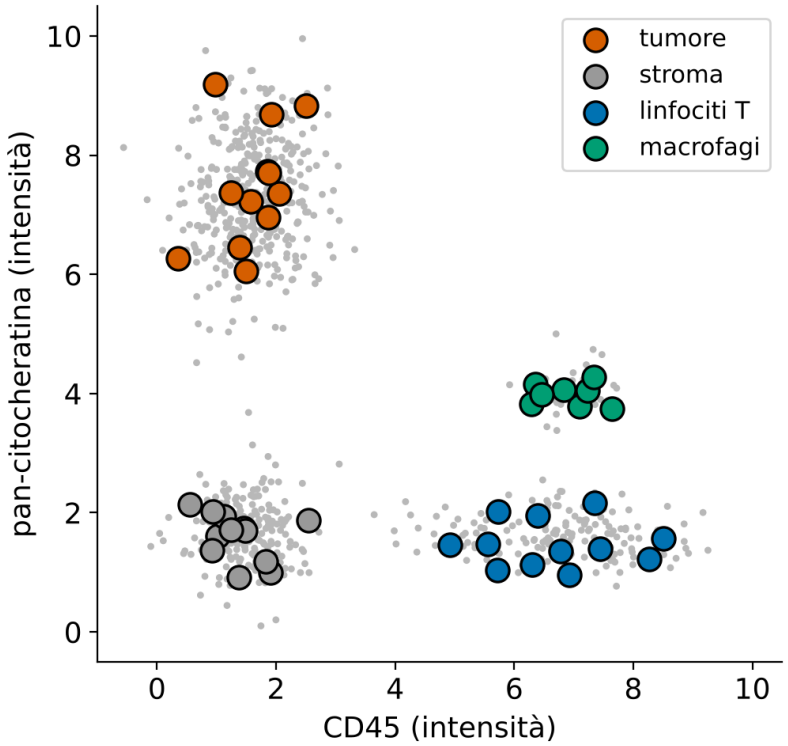


Gating manuale

Classificazione delle cellule

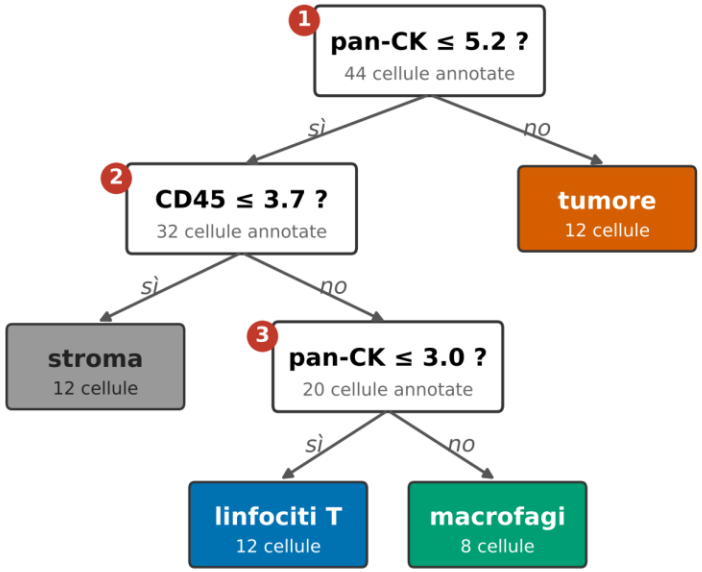
Quali geni/proteine sono espressi post trattamento nelle cellulare tumorali?
Alcuni tipi cellulari sono più o meno abbondanti in una condizione rispetto a un'altra?

Annotazioni manuali

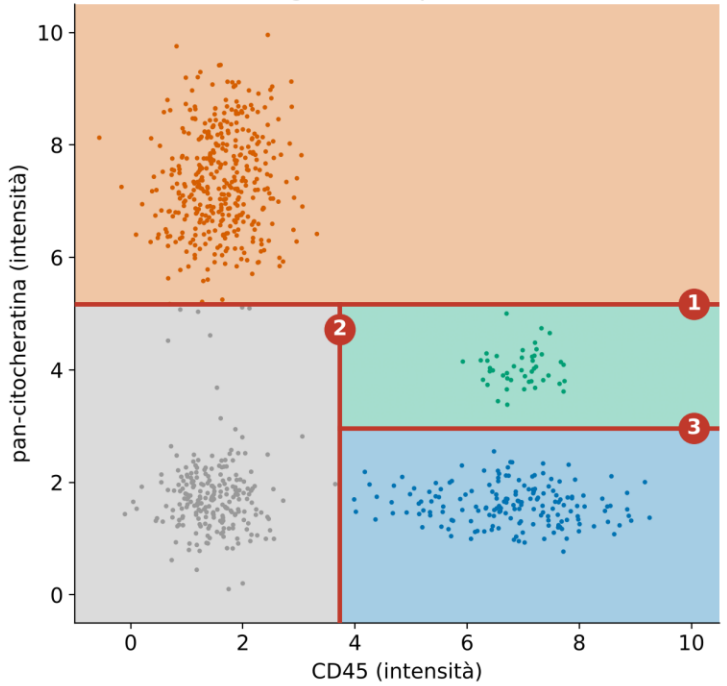


Classificazione supervisionata

Albero di decisione imparato dai dati



Le stesse soglie nello spazio dei marcatori

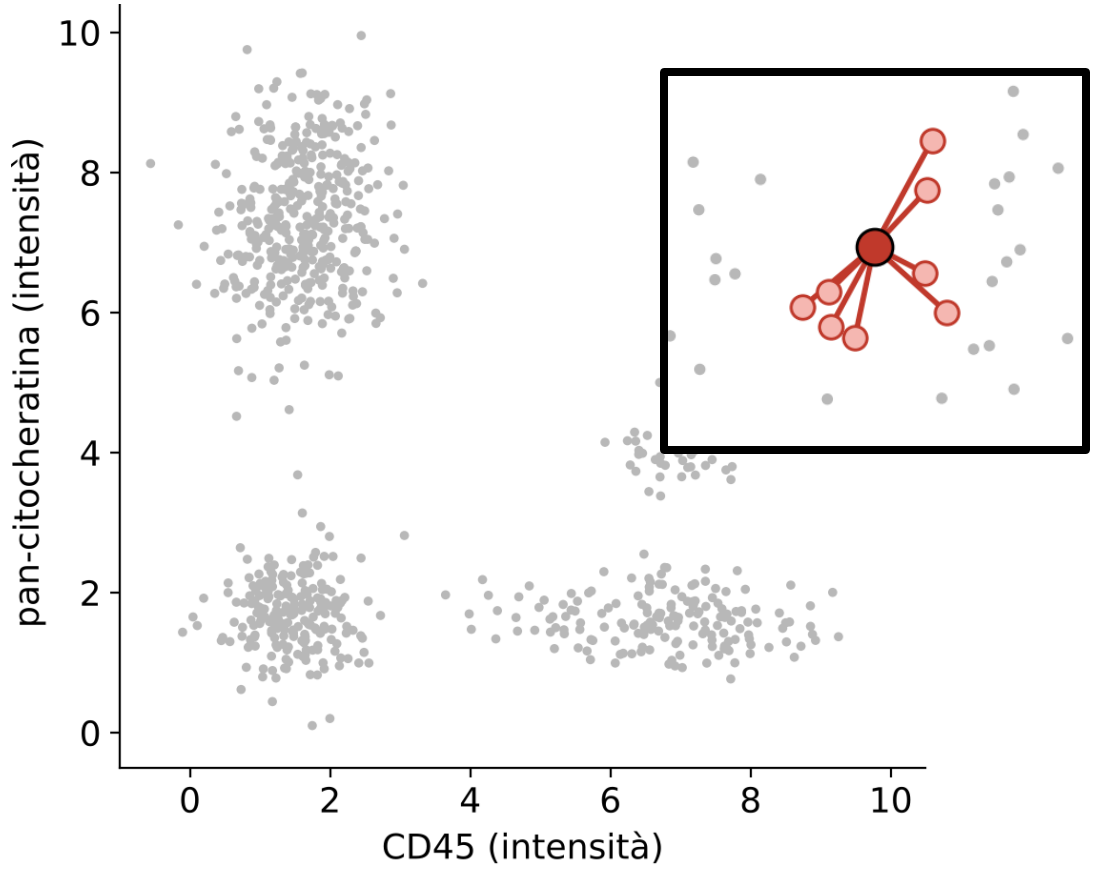


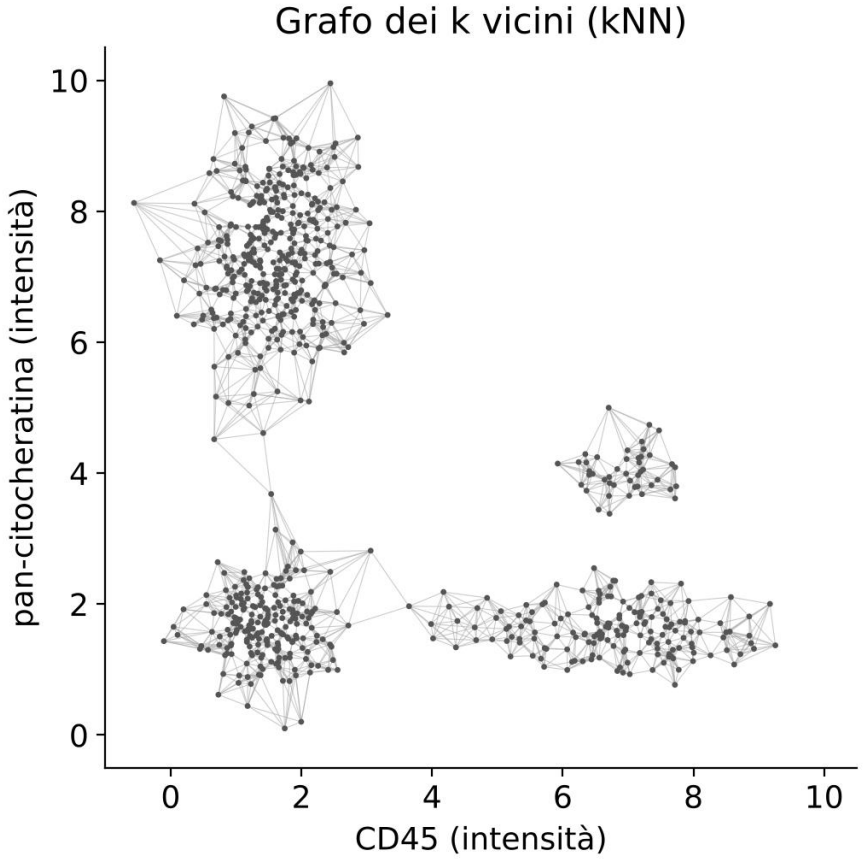
Random Forest

Classificazione delle cellule

Quali geni/proteine sono espressi post trattamento nelle cellulare tumorali?
Alcuni tipi cellulari sono più o meno abbondanti in una condizione rispetto a un'altra?

Classificazione non supervisionata: Clustering con grafo KNN + Leiden





Classificazione delle cellule

Quali geni/proteine sono espressi post trattamento nelle cellulare tumorali?
Alcuni tipi cellulari sono più o meno abbondanti in una condizione rispetto a un'altra?

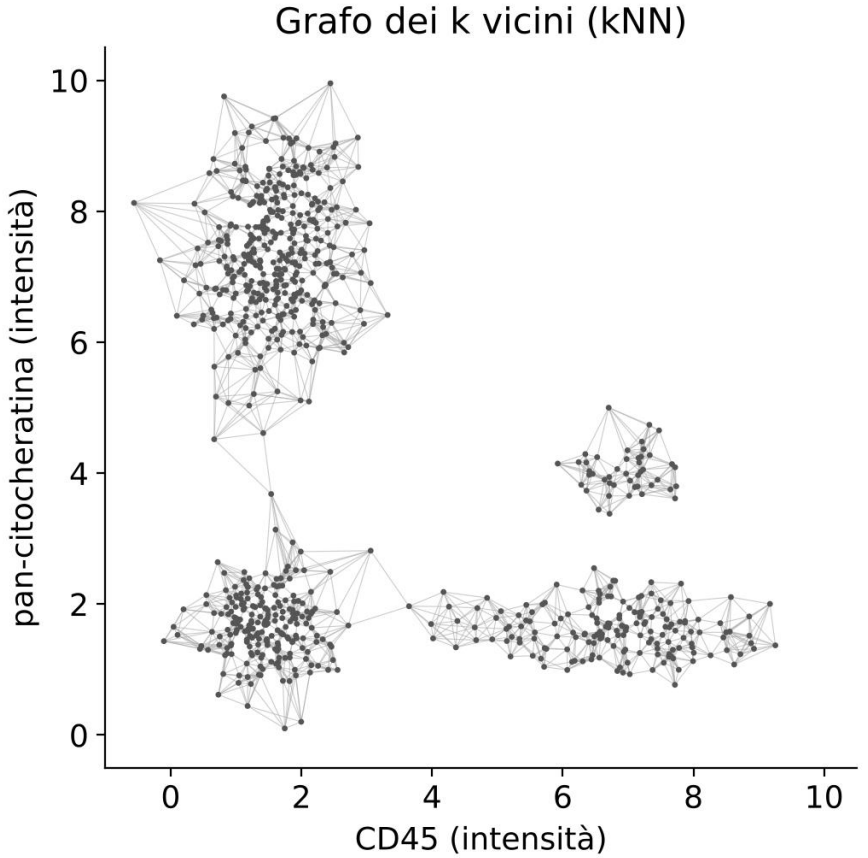
Classificazione non supervisionata: Clustering con grafo KNN + Leiden

Modularità misura quanto è buona una suddivisione

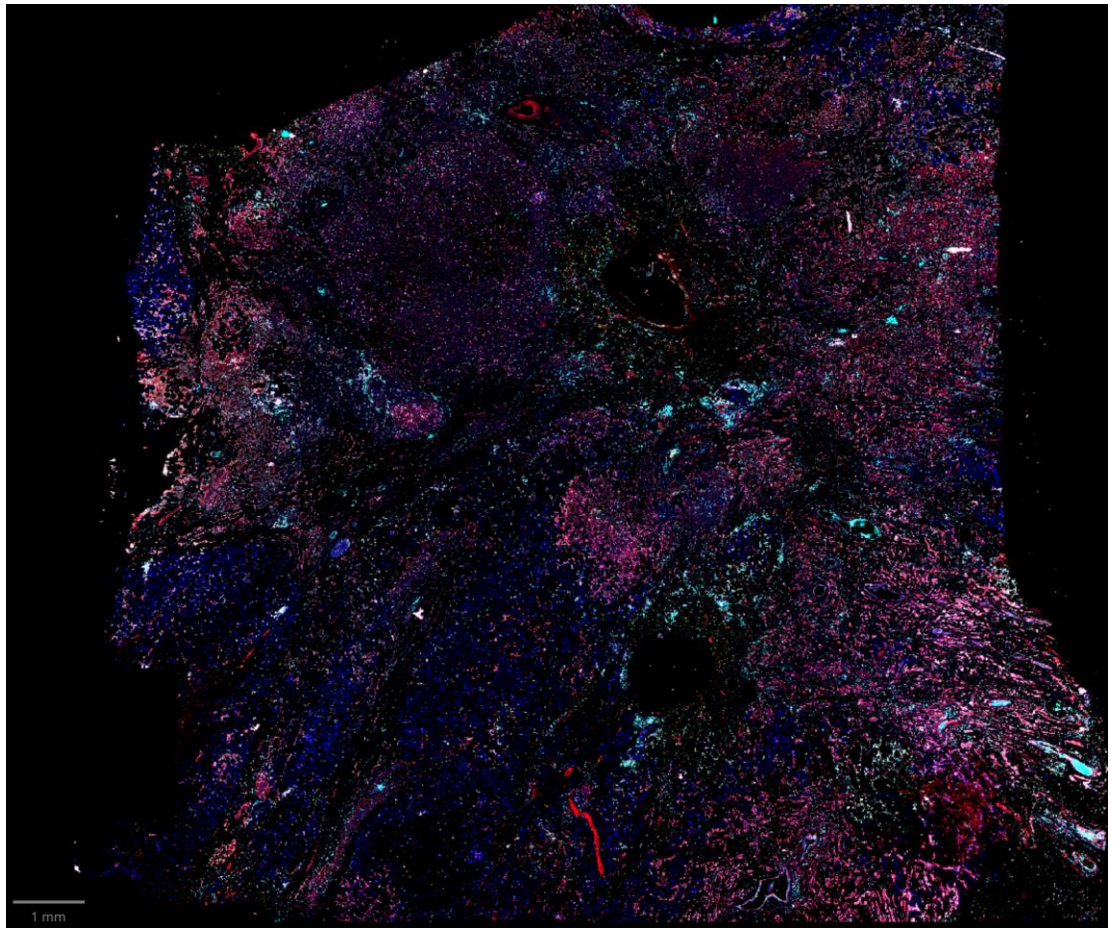
$$Q = \frac{1}{2m}\sum_{ij}\left(A_{ij} - \gamma\,\frac{k_i k_j}{2m}\right)\delta(c_i, c_j)$$

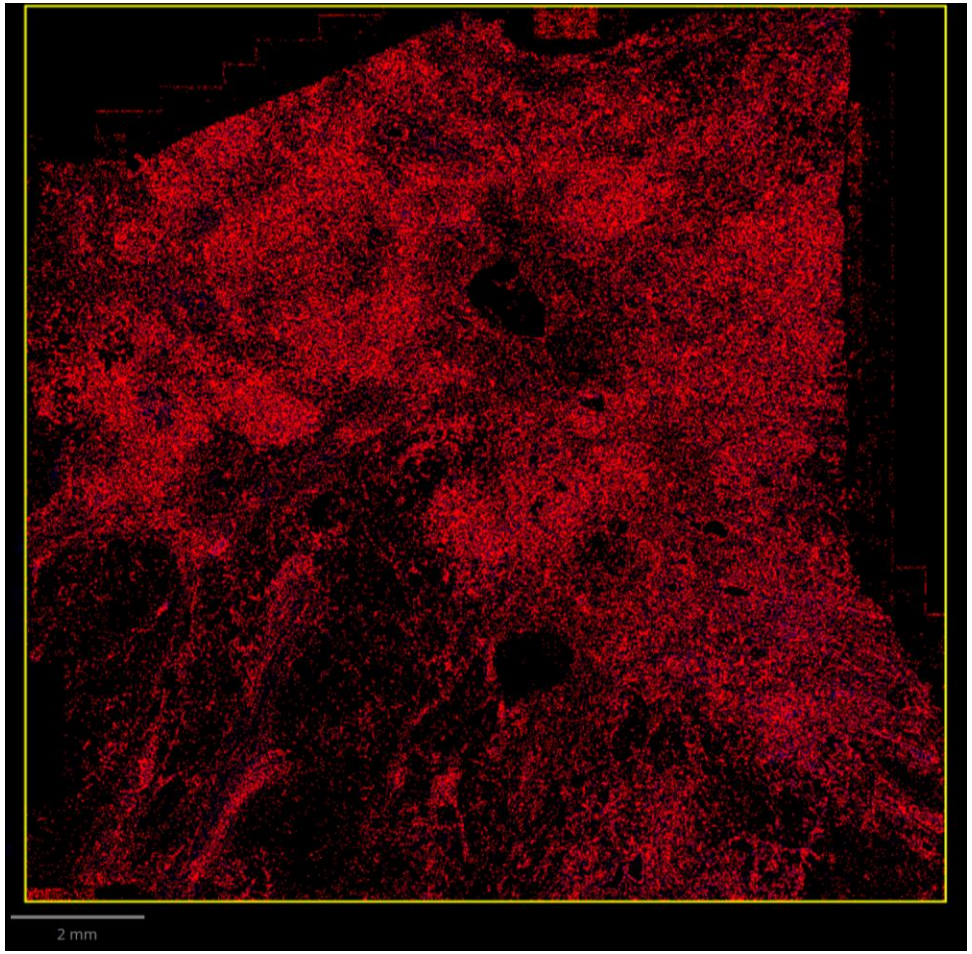
Una suddivisione è buona quando ha un gruppo di nodi con molti collegamenti al proprio interno e pochi verso l'esterno

Trovare la suddivisione che massimizza Q

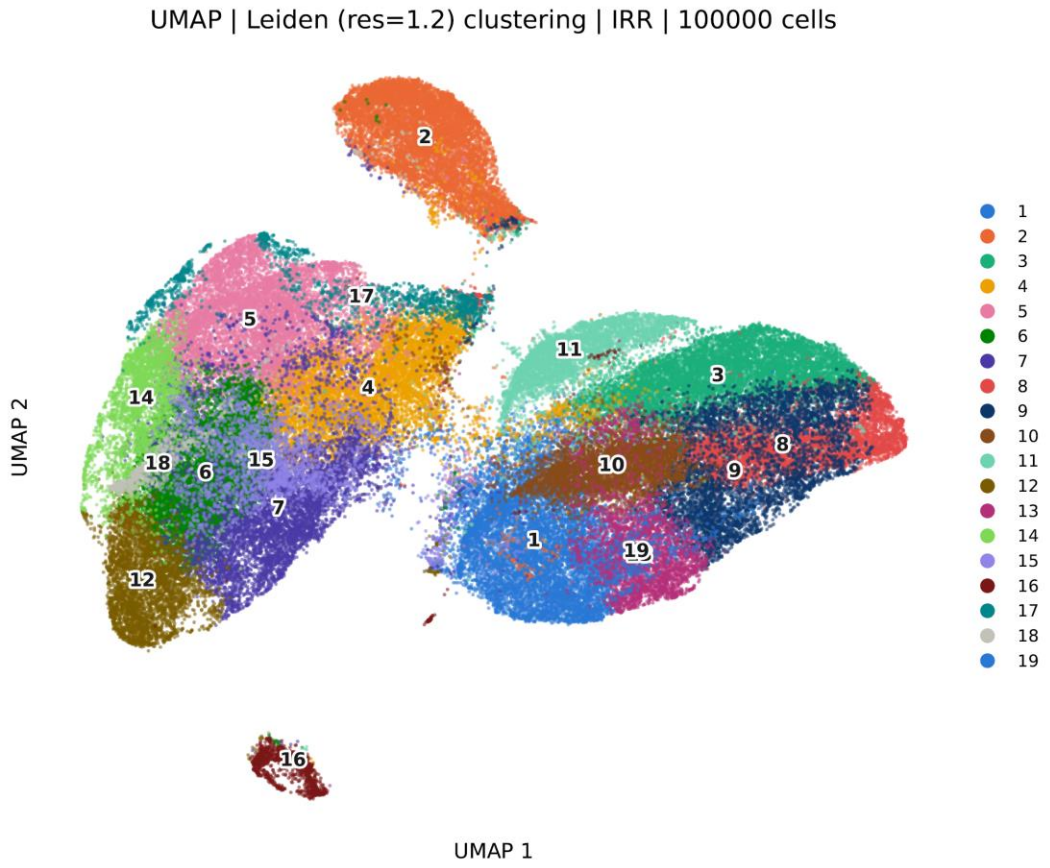


Classificazione delle cellule

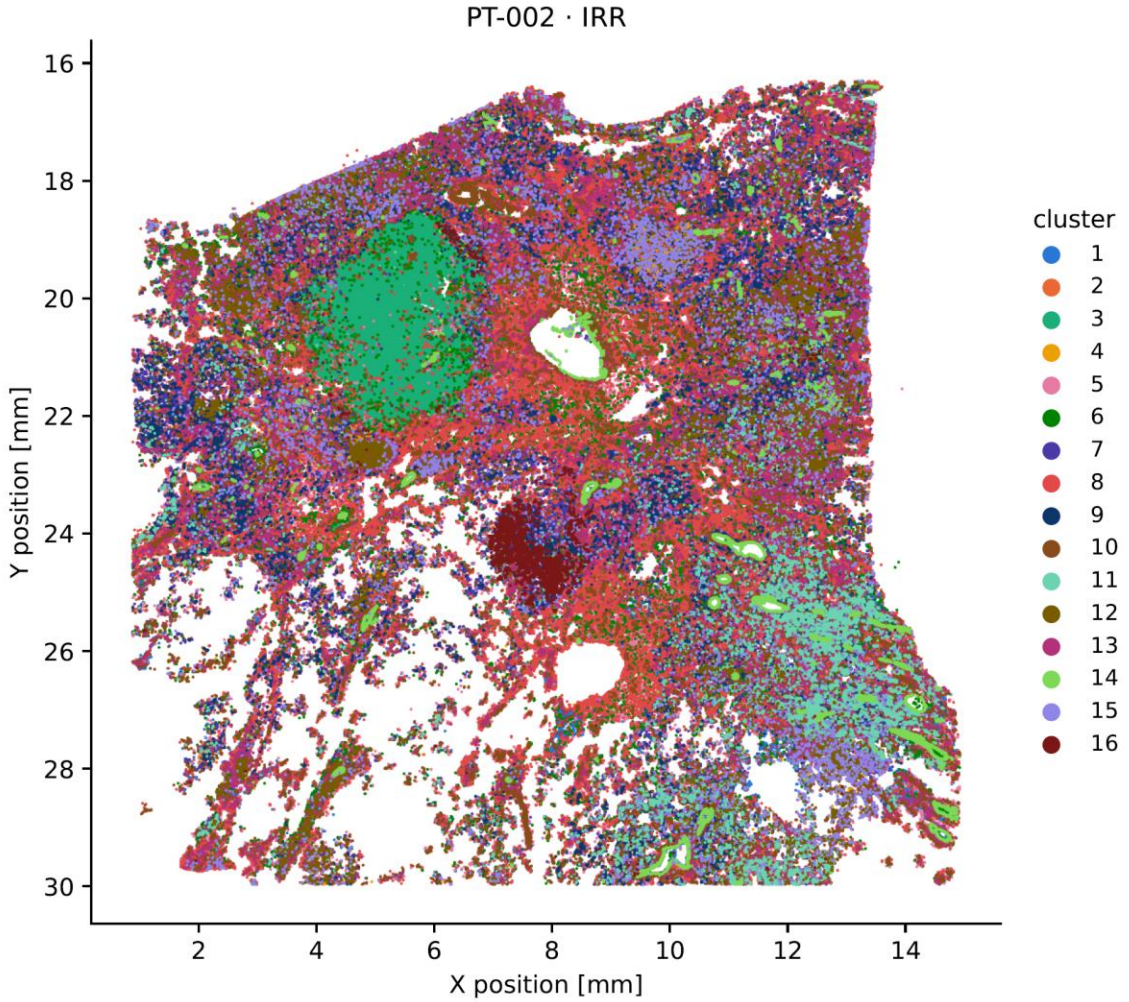




Classificazione delle cellule

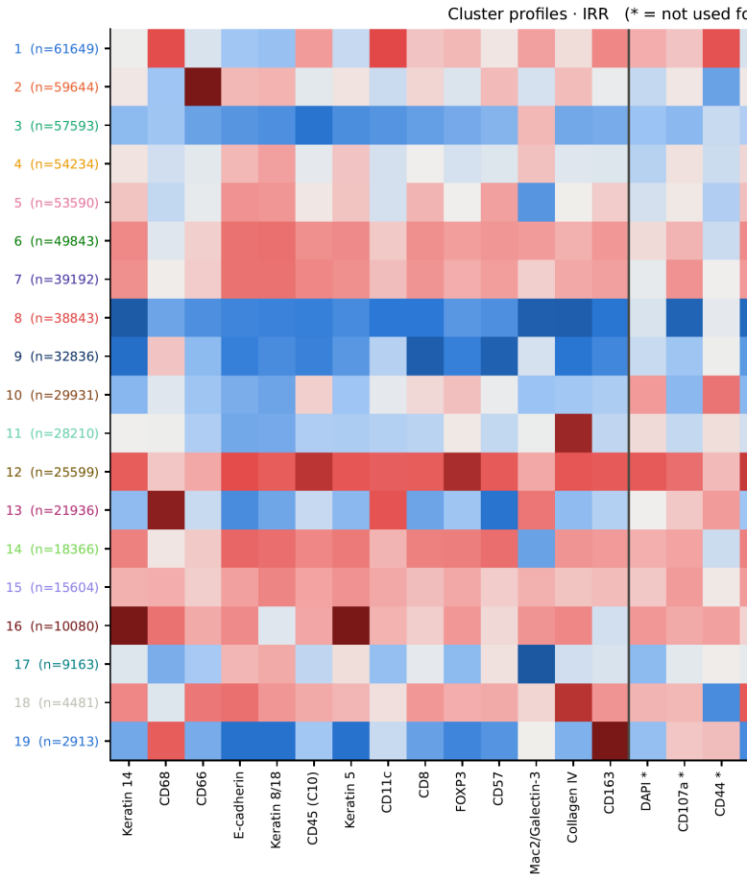


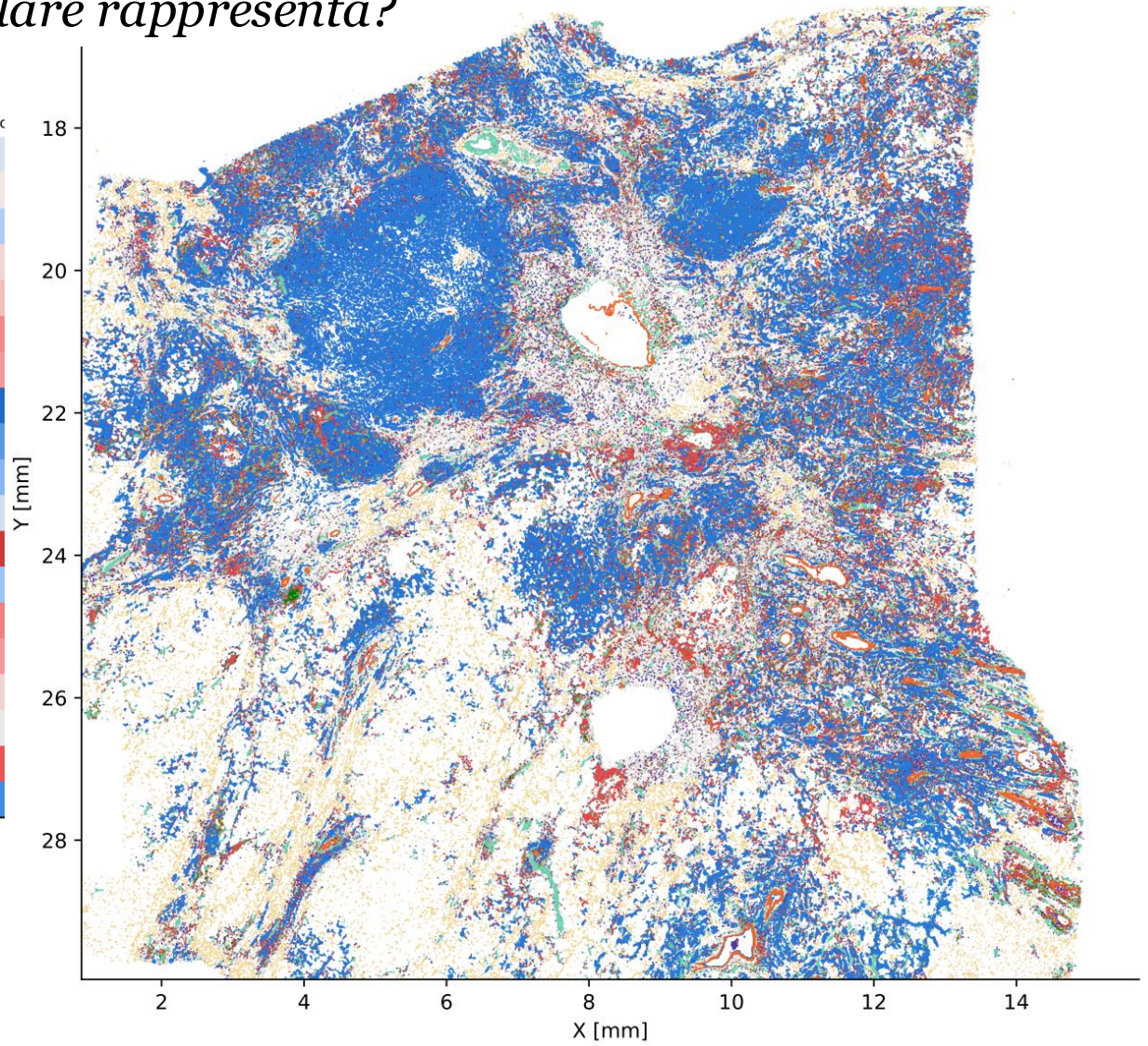
KNN+Leiden



Classificazione delle cellule

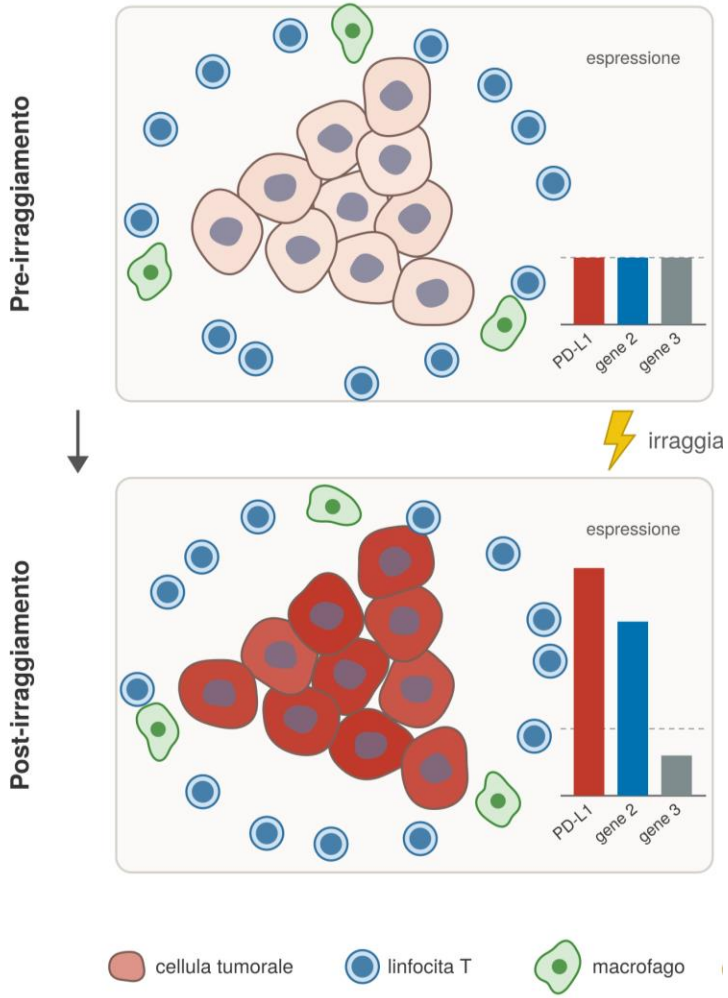
Ogni cluster che tipo cellulare rappresenta?





Espressione differenziale

*Quali **geni/proteine** cambiano in modo statisticamente significativo in un certo tipo cellulare post trattamento?*



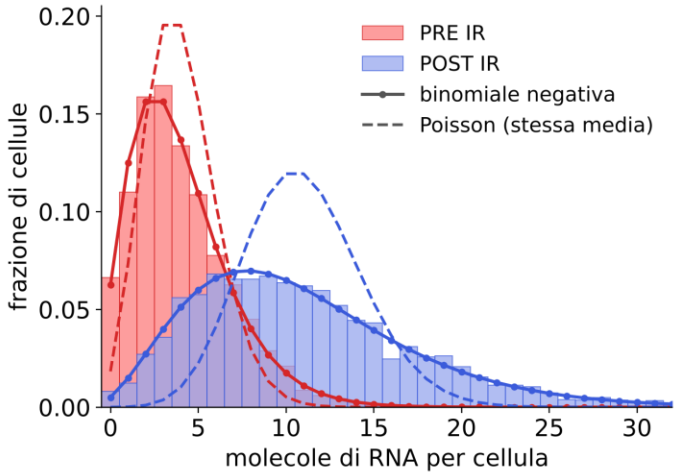
Espressione differenziale

*Quali **geni/proteine** cambiano in modo statisticamente significativo in un certo tipo cellulare post trattamento?*

- ***Modello dei conteggi di RNA (il dato è sovra-disperso)***
- Distribuzione binomiale negativa (mistura Gamma-Poisson):
  $x_{gi} \sim \mathrm{NB}(\mu_{gi}, \alpha_g), \qquad \mathrm{Var}(x_{gi}) = \mu_{gi} + \alpha_g \mu_{gi}^2$

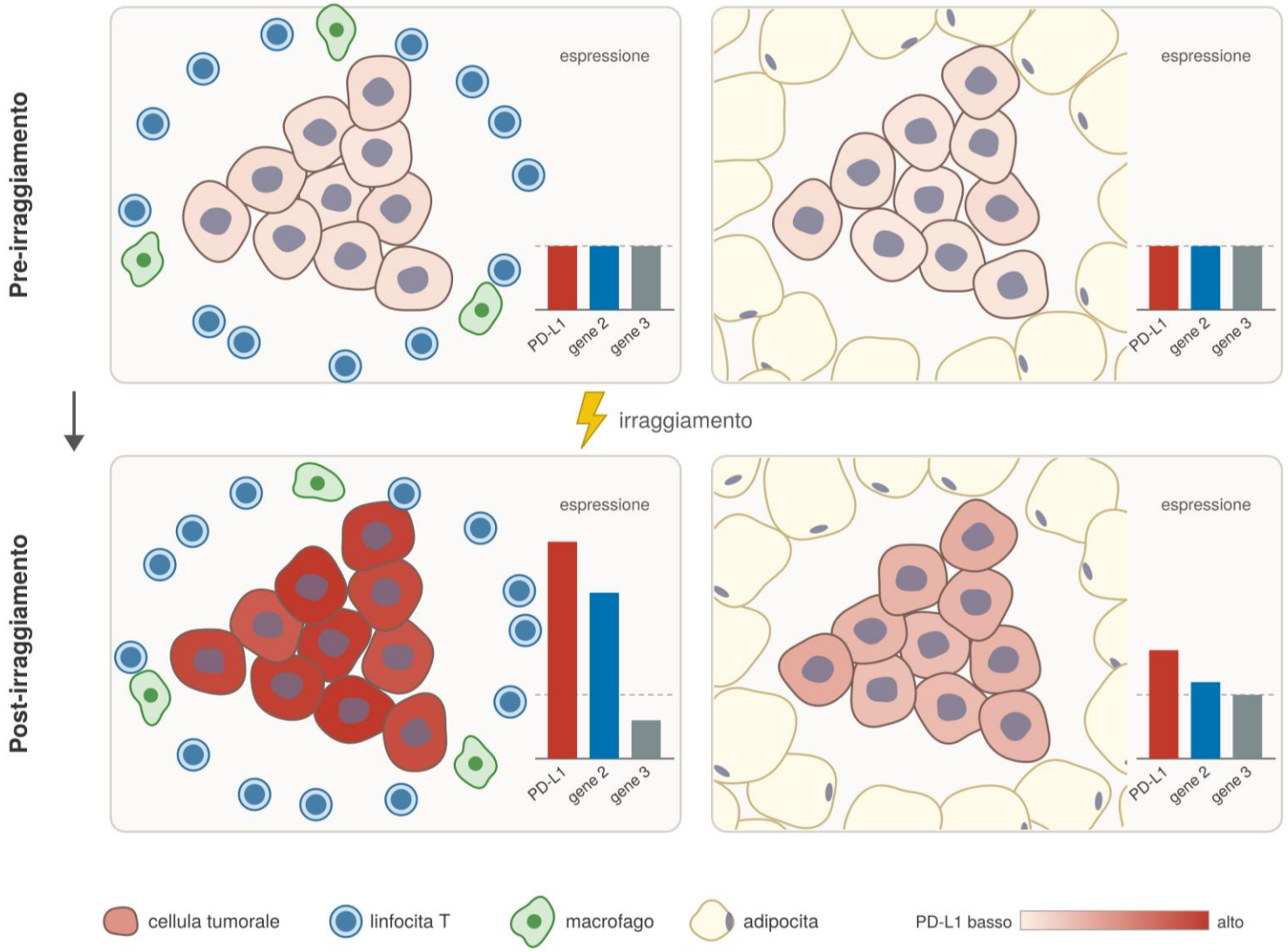
μ= rumore di conteggio (Poisson), $\alpha_g \mu^2$ = variabilità biologica

- Modello lineare generalizzato (GLM) con link logaritmico:
  $$\log \mu_{gi} = \log s_i + \beta_0 + \beta_1 \,\mathrm{condizione}_i$$
  s_i= fattore di normalizzazione (molecole totali o area della cellula)
  β_1 = log fold change
- Test: $H_0: \beta_1 = 0$



- *Proteine: intensità continue → trasformazione arcsinh + modello lineare*

Analisi Spaziale

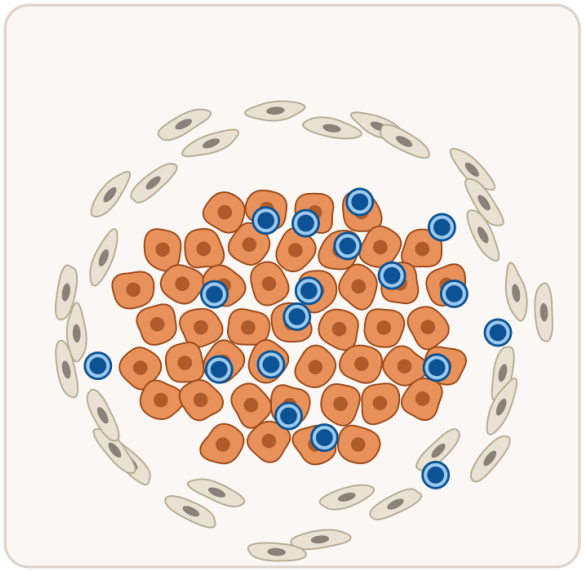


1. **Distanze tra tipi cellulari uguali o diversi**
   Esempio: i linfociti T si avvicinano alle cellule tumorali dopo l'irraggiamento?
2. **Identificazione delle nicchie tumorali**
   Esempio: nido tumorale, fronte di invasione, stroma, tessuto adiposo
3. **Contributo dell'organizzazione spaziale all'espressione differenziale di geni e proteine**
   Esempio: PD-L1 aumenta di più nelle cellule tumorali circondate da linfociti T?

Analisi Spaziale: interazione cellula-cellula

Infiltrato *(inflamed)*

i linfociti T entrano nel tumore

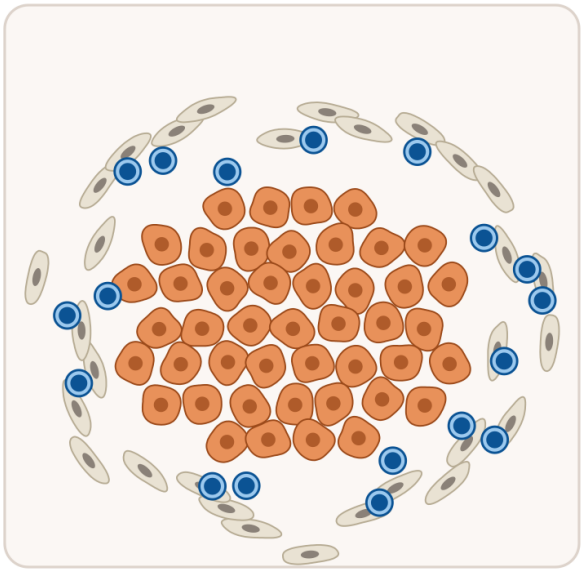


linfociti T: **18**

✓ **risposta all'immunoterapia più probabile**

Escluso *(excluded)*

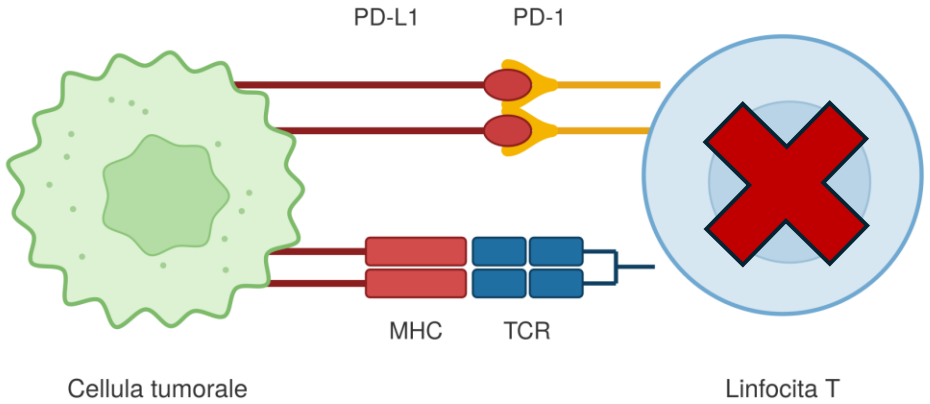
i linfociti T restano nello stroma

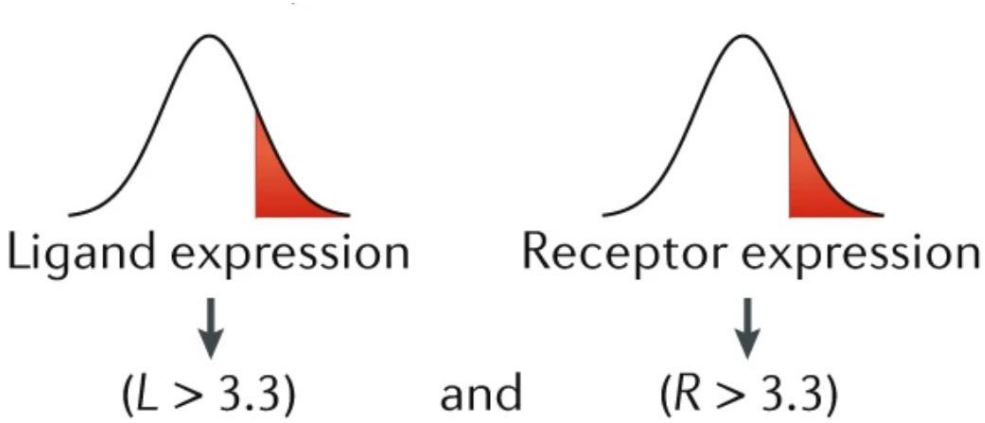


linfociti T: **18**

× **risposta meno probabile**

Interazione ligando recettore

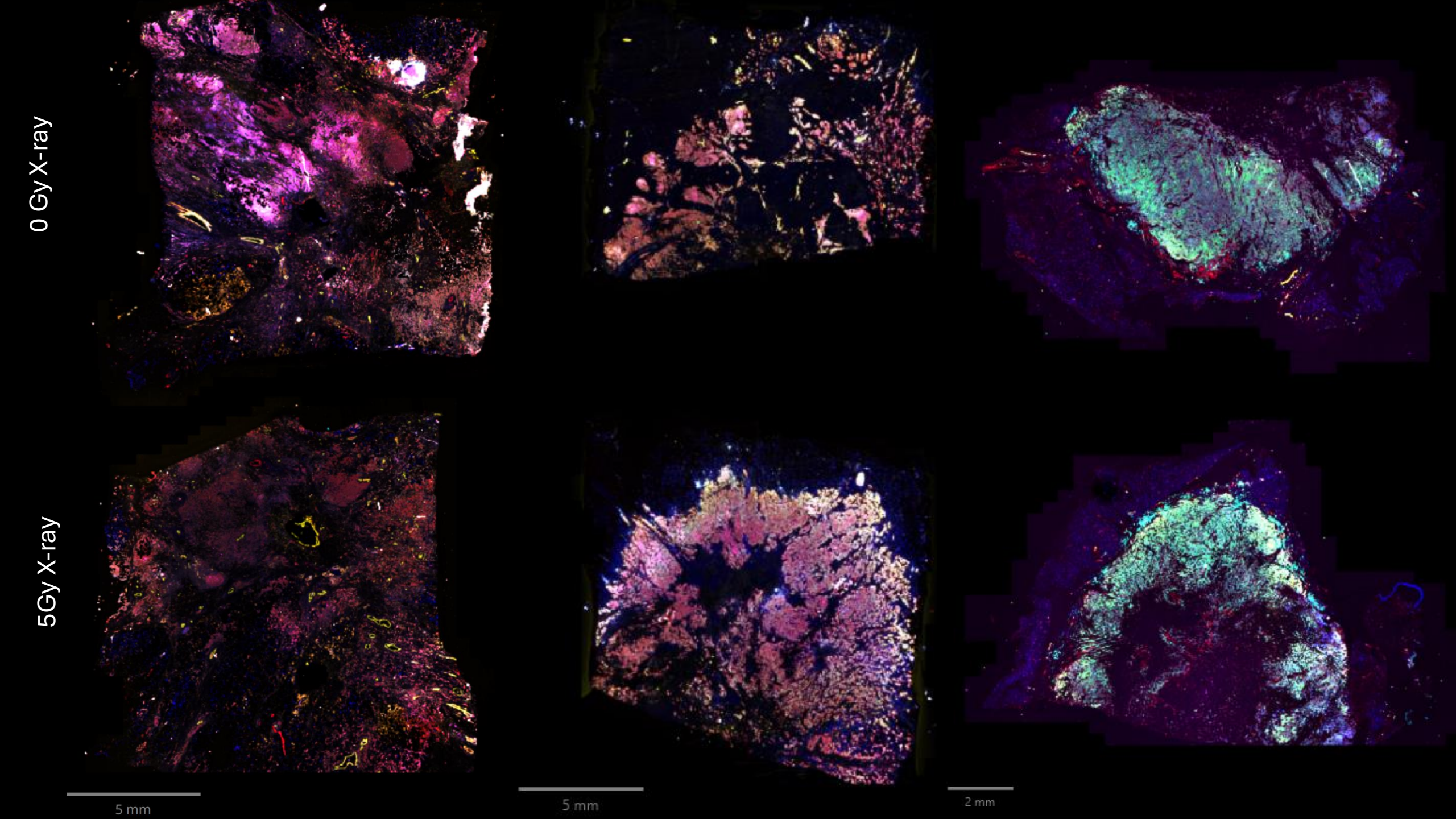




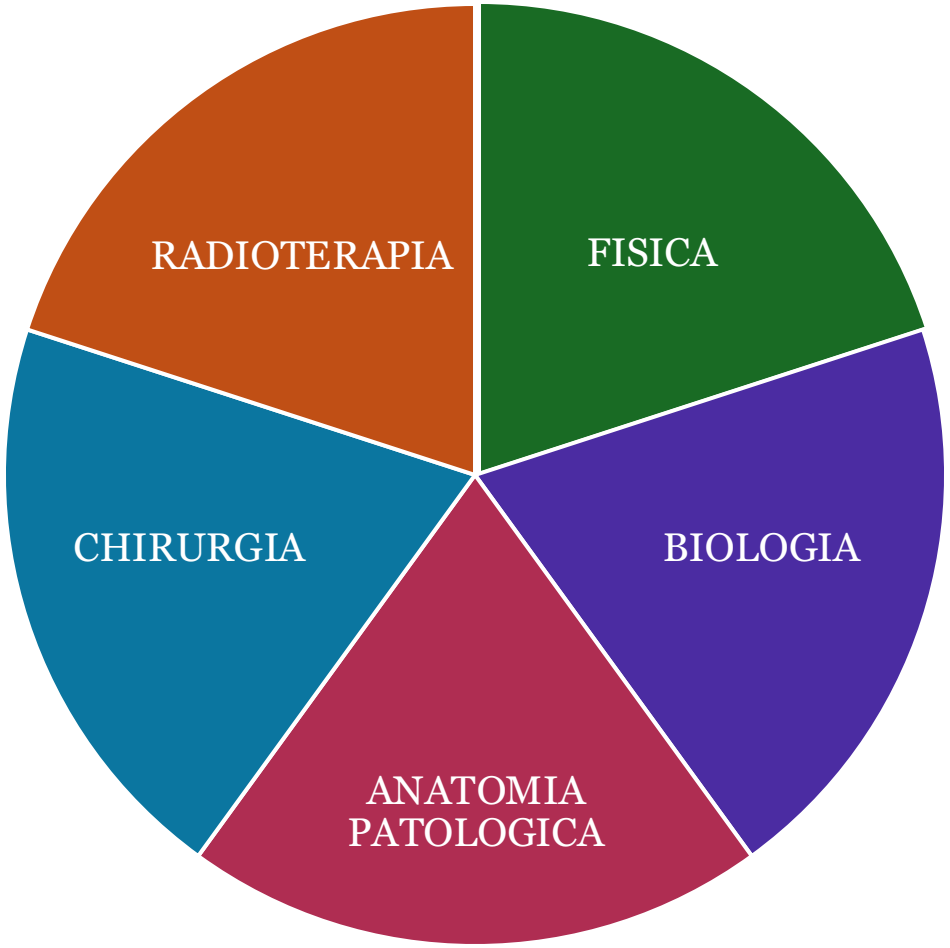
Conclusioni e prospettive

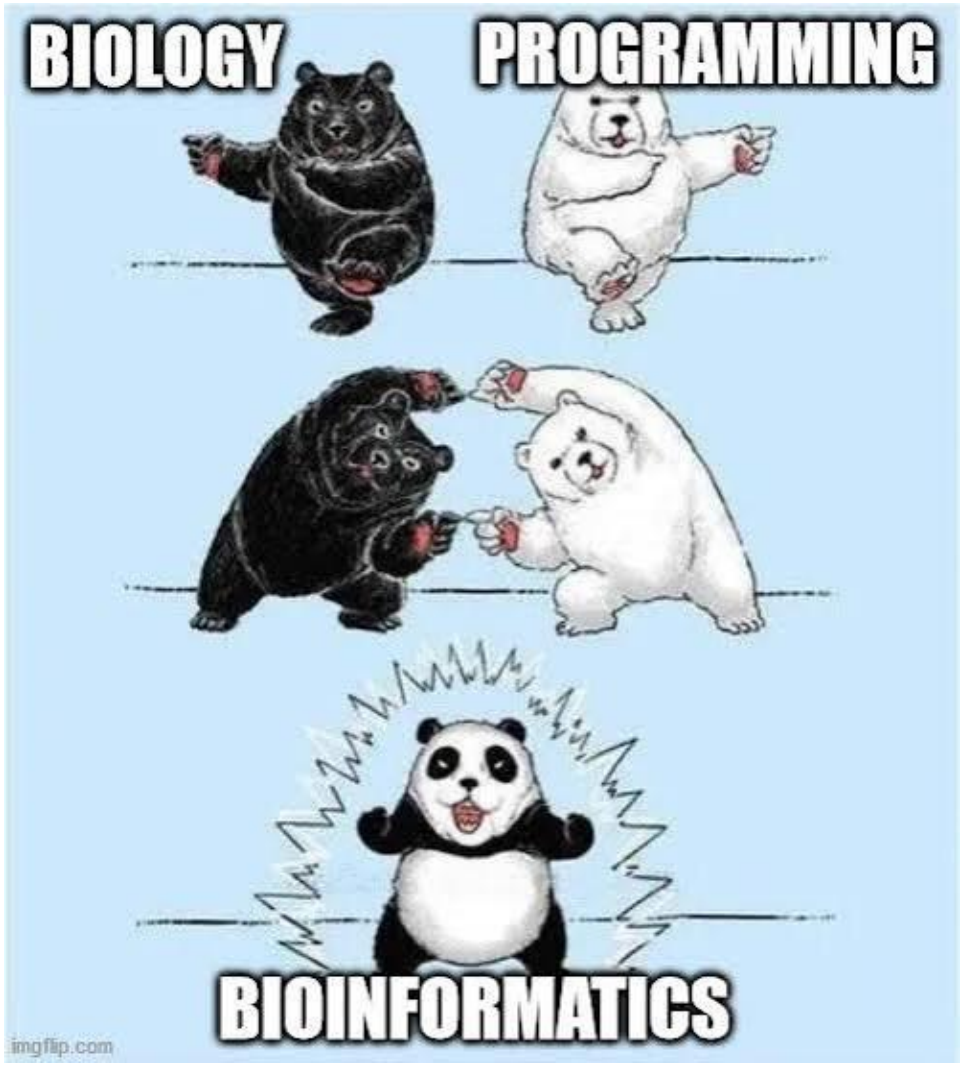
- Le omiche spaziali misurano *cosa* esprime ogni cellula e *dove* si trova
- Due famiglie di tecniche complementari: l'imaging in situ (MERFISH, Xenium, CosMx, PhenoCycler) ha risoluzione sub-cellulare ma misura geni e proteine scelti in anticipo; il sequenziamento con codici a barre spaziali (Visium HD) misura tutto il trascrittoma codificante su una griglia da 8 µm
- Il contesto spaziale cambia l'interpretazione biologica

- **Improved Multi-omica sulla stessa sezione**: misurare RNA, proteine e istologia nelle *stesse* cellule, per collegare l'espressione dei geni alla presenza effettiva delle proteine e alla morfologia del tessuto;
- **Omiche spaziali 3D**: dalla singola sezione di 5-10 µm alla ricostruzione del tessuto in volume, con sezioni seriali allineate o imaging di campioni spessi;
- **Traslazione clinica**: usare l'architettura del microambiente come biomarcatore per scegliere e combinare i trattamenti, per esempio radioterapia e immunoterapia


0 Gy X-ray
5Gy X-ray
5 mm
5 mm
2 mm

Interdisciplinarietà





Radiation Biophysics and Radiobiology



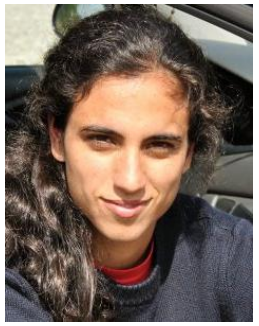
G. Baiocco,
group leader



I. Guardamagna,
Lab Technician



L. Lonati,
Postdoc researcher



A. Mentana,
Postdoc reseacher



C. Riani,
PhD candidate
(XL cycle)

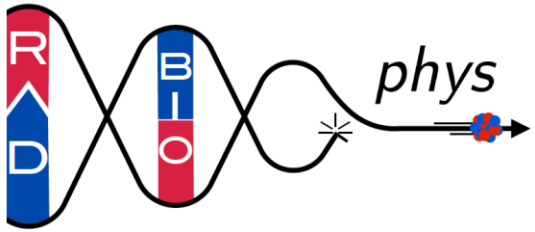


R. Semerano,
Research fellow



G. Gonon,
Contract researcher

http://radbiophys.unipv.eu/



Incontri di Fisica Moderna 2026

Leonardo Lonati, Alice Mentana, Cecilia Riani



UNIVERSITÀ
DI PAVIA