

INSTYTUT ZOOTECHNIKI
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Rozprawa doktorska

Dziedzina: Nauki Rolnicze

Dyscyplina naukowa: Zootechnika i Rybactwo

**Wpływ mączki z larw muchy *Hermetia illucens* i astaksantyny
na wyniki produkcyjne, status zdrowotny oraz strukturę
i funkcjonalność przewodu pokarmowego świń**

mgr inż. Kinga Szczepanik

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
promotora Prof. dr hab. Małgorzaty Świątkiewicz,
oraz promotora pomocniczego
Dr hab. Piotra Dobrowolskiego, prof. UMCS

Kraków, 2025 rok

Chciałbym serdecznie podziękować Pani prof. dr hab. Małgorzacie Świątkiewicz za pomoc, wsparcie i cenne wskazówki podczas całego procesu realizacji mojej pracy. Pani wiedza, zaangażowanie oraz cierpliwość były dla mnie nieocenione. Dziękuję za poświęcony czas, motywację oraz inspirację, które pomogły mi rozwinąć moje umiejętności i pogłębić wiedzę.

Chciałbym ogromnie podziękować Panu dr hab. Piotrowi Dobrowolskiemu, prof. UMCS za pomoc i wsparcie podczas realizacji mojej pracy. Pańska wiedza, życzliwość i cenne wskazówki były dla mnie ogromnym wsparciem. Dziękuję za poświęcony czas oraz pomoc w rozwiązywaniu trudnych kwestii, zwłaszcza w dziedzinie histologii.

Pragnę również podziękować pani dr hab. Marii Oczkowicz, prof. IZ za duże wsparcie w analizach genetycznych.

Szczere wyrazy wdzięczności kieruję również do Pani prof. dr hab. Beaty Szymczyk oraz Pani dr hab. Anny Arczewskiej-Włosek, prof. IZ za wsparcie i pomoc. Dziękuję również wszystkim pracownikom Zakładu Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa za cenne uwagi, pomoc i wsparcie.

Szczególne podziękowania kieruję do moich najbliższych, Rodziców, przyjaciół i C. Dziękuję za wsparcie, wiarę we mnie i bycie zawsze obok, kiedy Was potrzebowałam.

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 11.03.2025

Podpis promotora Prof. Dr hab. Małgorzata Świątkiewicz
Małgorzata Świątkiewicz

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/Promotorów/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data 11.03.2025

Podpis autora Krystyna Szwedek
Krystyna Szwedek

Spis treści

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	6
Wykaz stosowanych skrótów	8
1. Streszczenie	10
1.1. Streszczenie polskojęzyczne	10
1.2. Streszczenie anglojęzyczne	12
2. Wstęp.....	14
2.1. Problemy związane z okresem okołoodsadzeniowym prosiąt	14
2.2. Krajowe źródła białka paszowego	16
2.3. Wybrane dodatki paszowe jako stymulatory wzrostu i zdrowia prosiąt.....	18
2.3.1. Mączka z larw muchy <i>Hermetia illucens</i>	19
2.3.2. Astaksantyna	21
3. Hipotezy badawcze	24
4. Cel badań.....	24
5. Materiał i metody	26
5.1. Metodyka badań - Etap 1	26
5.2. Metodyka badań - Etap 2	27
5.2.1. Analizy chemiczne paszy	27
5.2.2. Analiza wskaźników hematologicznych krwi (P1).....	27
5.2.3. Analiza wskaźników biochemicznych krwi (P1)	28
5.2.4. Analiza immunoenzymatyczna (ELISA) enzymów związanych z ochroną antyoksydacyjną.....	28
5.2.5. Analiza chemiczna mięsa i słoniny (P1)	28
5.2.5. Analiza histomorfometryczna tkanki jelita cienkiego (P2) oraz analiza histologiczna tkanki wątroby (P3)	28
5.2.6. Analiza immunohistochemiczna tkanek jelita cienkiego (P2)	29
5.2.7. Izolacja RNA i ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR) w tkance wątroby (P3).....	31
5.2.8. Analizy statystyczne.....	31
6. Wyniki i dyskusja	33
6.1. Wpływ mączki z larw <i>Hermetia illucens</i> oraz astaksantyny na wskaźniki produkcyjne i zdrowotne prosiąt	33
6.2. Wpływ mączki z larw <i>Hermetia illucens</i> oraz astaksantyny na strukturę jelita cienkiego prosiąt	41
6.3. Wpływ mączki z larw <i>Hermetia illucens</i> oraz astaksantyny na proliferację i barierę jelitową jelita cienkiego prosiąt.....	49
6.4. Protekcyjne działanie astaksantyny w ograniczaniu skutków stresu oksydacyjnego....	53

6.4.1. Wpływ astaksantyny na strukturę histologiczną tkanki wątroby	55
6.4.2. Wpływ astaksantyny na ekspresję genów w tkance wątroby	56
7. Podsumowanie	59
9. Bibliografia.....	61
10. Spis tabel, wykresów i rycin	72
11. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (załącznik nr 1)	72
12. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (załącznik nr 2).....	72

Wykaz prac naukowych wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

P1. Szczepanik K., Furgał-Dierżuk I., Gala Ł., Świątkiewicz M. (2023). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin as feed additives on health and production indices in weaned pigs. *Animals*, 13(1), 163. <https://doi.org/10.3390/ani13010163>

MEIN₂₀₂₃ = 100 IF₂₀₂₄ = 2.7

Wkład autorski Szczepanik K.: udział w opracowaniu metodyki, udział w realizacji doświadczenia i pobieraniu próbek, wykonanie części analiz, udział w analizie otrzymanych danych, udział w wyborze programów statystycznych, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu oraz współredagowaniu powstałej publikacji.

P2. Szczepanik K., Dobrowolski P., Świątkiewicz M. (2024). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin on intestinal histology and expression of tight junction proteins in weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 108(6), 1820-1832. <https://doi.org/10.1111/jpn.14024>

MEIN₂₀₂₄ = 100 IF₂₀₂₄ = 2.2

Wkład autorski Szczepanik K.: udział w opracowaniu metodyki, wykonanie analiz, analiza otrzymanych danych, udział w wyborze programów statystycznych, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu oraz współredagowaniu powstałej publikacji.

P3. Szczepanik K., Oczkowicz M., Dobrowolski P., Świątkiewicz M. (2023). The protective effects of astaxanthin (AST) in the liver of weaned piglets. *Animals*, 13(20), 3268. <https://doi.org/10.3390/ani13203268>

MEIN₂₀₂₃ = 100 IF₂₀₂₄ = 2.7

Wkład autorski Szczepanik K.: udział w opracowaniu metodyki, wykonanie analiz, analiza otrzymanych danych, udział w wyborze programów statystycznych, wiodący udział w przygotowaniu manuskryptu oraz współredagowaniu powstałej publikacji.

P4. Szczepanik K., Świątkiewicz M. (2024). *Hermetia illucens* as a source of antimicrobial peptides—a review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Annals of Animal Science*, 24(1), 77-88. <https://doi.org/10.2478/aoas-2023-0071>

MEIN₂₀₂₄ = 140 IF₂₀₂₄ = 1.8

Wkład autorski Szczepanik K.: pomysł, napisanie oryginalnej formy manuskryptu, wiodący udział w współredagowaniu powstałej publikacji.

Sumaryczna punktacja MEIN: 440 punktów

Sumaryczny Impact Factor: 9.4

Źródło finansowania badań

Podstawą niniejszej dysertacji są wyniki badań finansowanych w ramach dotacji statutowej Instytutu Zootechniki PIB, pt. „Ocena wpływu innowacyjnych wysokobiałkowych pasz n-GMO pochodzenia krajowego na strawność składników pokarmowych, wskaźniki produkcyjne i status zdrowotny zwierząt gospodarskich”, o numerze rejestracyjnym: 01-16-06-11, realizowanych w latach 2020-2023.

Wykaz stosowanych skrótów

·OH – rodnik hydroksylowy

ALB - albumina

ALP - fosfataza alkaliczna

ALT – aminotransferaza alaninowa

AMP – ang. antimicrobial peptide, pepetydy antybakterijne

AspAT – aminotransferaza asparaginianowa

AST – astaksantyna

CAT - katalaza

CHOL - cholesterol całkowity

CREA - kreatynina

DPPH - 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl

FRAP - ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter*

GLU - glukoza

GMO - organizm modyfikowany genetycznie

GPX – peroksydaza glutationowa

GRA - granulocyty

H₂O₂ – nadtlenek wodoru,

HCT - hematokryt

HDL - lipoproteiny o dużej gęstości

HGB - hemoglobina

HI – *Hermetia illucens*

HIV/AIDS – ludzki wirus niedoboru odporności/zespół nabytego niedoboru odporności

HSV – wirus opryszczki zwykłej (*Herpes simplex virus*)

LA – kwas laurynowy

LDH - dehydrogenaza mleczanowa

LDL - lipoproteiny o małej gęstości

LYM – limfocyty

MCH - średnia hemoglobina krwinki czerwonej

MCV - średnia objętość krwinki czerwonej

MON – monocyt

MPV - średnia objętość płytek krwi

MRSA – szczep *Staphylococcus aureus* oporny na metycylinę

MUFA – całkowite jednonienasycone kwasy tłuszczone

O²⁻ – anion ponadtlenkowy

PCT - hematokryt płytakowy

PDW - wskaźnik heterogeniczności wielkości płytka krwi

PLT - płytki krwi

PUFA – całkowite wielonienasycone kwasy tłuszczone

qPCR - ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy

RBC - czerwone krwinki

RDWC - szerokość rozkładu czerwonych krwinek

ROS – reaktywne formy tlenu

SFA – całkowite nasycone kwasy tłuszczone

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

TBARS – ang. *thiobarbituric acid reactive substances*, test kwasu tiobarbiturowego

TG - trójglicerydy

TJ – ang. *tight junction*, białka połączeń ścisłych

TP - białko całkowite

UE – Unia Europejska

UFA – całkowite nienasycone kwasy tłuszczone

UREA - mocznik

VC – stosunek długości kosmków do głębokości krypt

WBC - białe krwinki

1. Streszczenie

1.1. Streszczenie polskojęzyczne

Odsadzenie prosiąt to kluczowy moment w hodowli świń, obciążony ryzykiem zaburzeń jelitowych, stresu oksydacyjnego i infekcji. W kontekście poszukiwania nowych źródeł białka oraz dodatków paszowych o działaniu prozdrowotnym, badano pełnotłustą mączkę z larw muchy *Hermetia illucens* (HI), bogatą w aminokwasy i związki bioaktywne (peptydy antybakterijne, chitynę, kwas laurynowy) wspierające odporność. Ponadto, oceniano wpływ astaksantyny (AST), silnego naturalnego antyoksydantu, na równowagę oksydacyjną i status zdrowotny zwierząt. Doświadczenie miało na celu określenie wpływu mieszanki paszowej, wzboagaconej w naturalne substancje immunostymulujące pochodzące z mączki z larw muchy *Hermetia illucens* i astaksantyny, na rozwój przewodu pokarmowego, wskaźniki produkcyjne oraz status zdrowotny prosiąt. W doświadczeniu wykorzystano 48 prosiąt (6 grup po 8 osobników), których paszę suplementowano mączką HI (0; 2,5%; 5%) i/lub AST (0; 0,25 mg/kg). W ramach doświadczenia, oprócz oceny podstawowych wskaźników produkcyjnych, przeprowadzono szereg analiz, w tym badania biochemiczne i hematologiczne krwi, analizy immunoenzymatyczne, immunohistochemiczne i histologiczne oraz genomiczne. Wykonano również analizy chemiczne mięsa oraz słońiny.

Wyniki wskazują, że włączenie mączki HI i AST do dawki pokarmowej nie miało negatywnego wpływu na wyniki wzrostu, masę narządów i odcinków przewodu pokarmowego (obliczoną jako % masy ciała), a także zużycie paszy i średni dzienny przyrost masy ciała u prosiąt biorących udział w tym badaniu. Chociaż zaobserwowano statystycznie istotne różnice między grupami, parametry hematologiczne i biochemiczne krwi mieściły się w normach fizjologicznych, co sugeruje, że suplementacja mączką HI i AST nie wpływa negatywnie na stan zdrowia prosiąt. Analiza słońiny przechowywanej w zamrożeniu przez 3 miesiące wykazała, że dodatek do paszy AST razem z mączką HI obniżył poziom wskaźnika TBARS. Wynik ten wskazuje na możliwość wykorzystania tych dodatków jako skutecznego antyoksydantu, ograniczającego skutki peroksydacji lipidów w tkance tłuszczowej. W przypadku mięsa nie uzyskano tak wyraźnego efektu. Analizy histologiczne wykazały, że jednoczesne podawanie AST wraz z mączką HI na poziomie 2,5% znaczaco zwiększyło szerokość mięśniówki i jej warstw w dwunastnicy co potencjalnie może przyczynić się do lepszej perystaltyki. Z kolei 2,5% mączka HI wpłynęła na zwiększenie długości i szerokości kosmków, a podawana wraz z AST wpłynęła na polepszenie stosunku długości kosmków do głębokości krypt. W jelicie czczym zaobserwowano korzystny wpływ AST, która zwiększyła

szerokość błony śluzowej, grubość warstwy mięśni podłużnych, liczbę komórek kubkowych oraz wydłużyla kosmki, natomiast dodatni wpływ mączki HI na powierzchnię wchłaniania był widoczny zarówno w jelcie czzym, jak i krętym. Dodatkowo, stwierdzono zwiększoną proliferację komórek w kryptach dwunastnicy i jelita czzego, szczególnie w przypadku 2,5% suplementacji mączką HI. Analiza ekspresji białek połączeń ścisłych sugeruje, że najwyższa ekspresja występowała w grupie kontrolnej, niepodanej suplementacji dodatkami. W ramach realizacji badań przeprowadzono także ocenę wpływu astaksantyny na status zdrowotny wątroby prosiąt, uwzględniając zarówno histologię tkanki wątrobowej, jak i ekspresję genów związanych z jej funkcjonowaniem. W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano istotne różnice histologiczne między zwierzętami otrzymującymi dodatek AST w mieszance paszowej a tymi z grupy kontrolnej. W grupie suplementowanej AST stwierdzono znaczne zmniejszenie odkładania się włókien kolagenowych w tkance wątroby, co wskazuje na potencjalną rolę AST w ochronie przed nadmiernym gromadzeniem się kolagenu. Analiza ekspresji genów wykazała, że wątroba prosiąt otrzymujących paszę z dodatkiem AST charakteryzowała się obniżoną ekspresją genu *NR1H3*, którego hamowanie może wspierać regenerację hepatocytów po stłuszczeniu wątroby. Z kolei ekspresja genu *CYP7A1*, kluczowego dla metabolizmu cholesterolu i wydalania go poprzez syntezę kwasów żółciowych, była zwięksiona. Zmiany te sugerują, że AST może wspierać procesy detoksykacyjne i homeostazę lipidową w wątrobie. Ponadto, obserwowano obniżoną ekspresję genów *NOTCH1* i *CREB*, choć ich rola w łagodzeniu zwłóknienia wątroby pozostaje niejasna.

Podsumowując, można stwierdzić, że suplementacja paszy dla prosiąt w okresie okołoodsadzeniowym mączką HI i AST może stanowić cenne uzupełnienie diety prosiąt, poprawiając strukturę i funkcjonowanie jelit i wątroby, wspierając status zdrowotny oraz korzystnie wpływając na stabilność oksydacyjną tkanki tłuszczowej, bez negatywnego wpływu na wskaźniki produkcyjne zwierząt.

1.2. Streszczenie anglojęzyczne

Weaning is a critical phase in pig breeding, often associated with an increased risk of intestinal disorders, oxidative stress, and infections. In the context of climate change and the need for alternative protein sources, this study investigated the effects of a full-fat meal derived from *Hermetia illucens* (HI) larvae—rich in amino acids and bioactive compounds (antimicrobial peptides, chitin, lauric acid)—on piglet immunity. Additionally, the impact of astaxanthin (AST), a potent natural antioxidant, on oxidative balance and overall health status was evaluated. The study was designed to assess the effects of HI larvae meal and AST supplementation on the production performance and health status of weaned piglets. A total of 48 piglets were assigned to six groups ($n = 8$ per group) with diets supplemented with HI meal (0%, 2.5%, or 5%) and/or AST (0 or 0.25 mg/kg). In addition to evaluating basic production parameters, a series of analyses were conducted, including biochemical and hematological blood tests, immunoenzymatic, immunohistochemical, histological, and genomic assessments. Chemical analyses of meat and fat composition were also performed. The results indicate that the inclusion of HI and AST meal in the feed ration had no negative effect on growth performance, weight of organs and gastrointestinal tract sections (calculated as % of body weight), as well as feed consumption and average daily weight gain in the piglets participating in this study. Although statistically significant differences were observed between groups, hematological and biochemical blood parameters were within physiological norms, suggesting that HI and AST meal supplementation does not adversely affect piglet health. Analysis of lard stored frozen for 3 months showed that the addition of AST to the feed along with HI meal reduced the level of the TBARS index. This result indicates that these additives can be used as an effective antioxidant to reduce the effects of lipid peroxidation in adipose tissue. In the case of meat, no such clear effect was obtained. Histological analyses showed that simultaneous administration of AST along with HI meal at 2.5% levels significantly increased the width of the muscularis and its layers in the duodenum, which could potentially contribute to better peristalsis. In contrast, 2.5% HI meal increased the length and width of the villi, and when administered together with AST, improved the ratio of villi length to crypt depth. In the jejunum, a beneficial effect of AST was observed, which increased the width of the mucosa, the thickness of the longitudinal muscle layer, the number of goblet cells and lengthened the villi, while a positive effect of HI meal on the absorption surface was seen in both the jejunum and ileum. In addition, there was increased cell proliferation in the crypts of the duodenum and jejunum, particularly with 2.5% HI meal supplementation. Analysis of the expression of tight junction proteins suggested that the highest expression was in the control group, not subjected to

supplementation with supplements. As part of the implementation of the study, the effect of astaxanthin on the health status of the piglet liver was also evaluated, taking into account both the histology of the liver tissue and the expression of genes related to its function. In the experiment conducted, significant histological differences were observed between animals receiving AST supplementation in the feed mixture and those in the control group. In the AST-supplemented group, there was a significant reduction in the deposition of collagen fibers in liver tissue, indicating a potential role for AST in protecting against excessive collagen accumulation. Gene expression analysis showed that the liver of piglets receiving AST-supplemented feed had reduced expression of the *NR1H3* gene, whose inhibition may promote hepatocyte regeneration after liver steatosis. In contrast, expression of the *CYP7A1* gene, which is key to cholesterol metabolism and excretion via bile acid synthesis, was increased. These changes suggest that AST may promote detoxification processes and lipid homeostasis in the liver. In addition, reduced expression of *NOTCH1* and *CREB* genes was observed, although their role in alleviating liver fibrosis remains unclear.

In conclusion, it can be concluded that the supplementation of piglet feed during the peri-weaning period with HI and AST meal can be a valuable addition to piglet diets, improving the structure and function of the intestine and liver, promoting health status, and favorably influencing the oxidative stability of adipose tissue, without adversely affecting animal production rates.

2. Wstęp

W produkcji trzody chlewnej największe straty wynikające z upadków zwierząt, stanowiące ponad 80% wszystkich strat świń, notuje się w okresie od urodzenia do odsadzenia od lochy. W tym czasie prosięta narażone są na wiele czynników stresogennych (zarówno żywieniowych, behawioralnych, jak i środowiskowych), które nakładają się na zmiany jakie zachodzą w rozwijającym się układzie pokarmowym i odpornościowym. Zespół czynników stresu związanego z odsadzeniem powoduje u prosiąt zaprzestanie pobierania pokarmu, co prowadzi do niekorzystnych zmian w jelcie cienkim oraz do wystąpienia stresu oksydacyjnego (Campbell i in., 2013; Pluske i in., 2003). Do 2006 roku w celu zapobiegania potencjalnym chorobom na jakie narażane są prosięta w tym w okresie, dozwolone było profilaktyczne stosowanie antybiotyków paszowych, które przyczyniły się do powstania lekooporności wielu szczepów bakterii. Zjawisko to jest wysoce groźne zarówno dla zwierząt jak i ludzi. Stąd też prowadzone są badania mające na celu znalezienie substancji (nie będących antybiotykami), które oddziaływałyby na stan zdrowia zwierząt zwiększając ich odporność oraz stymulując rozwój układu pokarmowego. Dlatego też optymalizacja składu paszy i wybór odpowiednich dodatków paszowych należą do działań stosowanych w celu poprawy stanu zdrowia prosiąt i ograniczenia stosowania środków antybiotykowych (Kil i Stein, 2010; Szczepanik i Świątkiewicz, 2024).

2.1. Problemy związane z okresem okołoodsadzeniowym prosiąt

Jednym z najtrudniejszych etapów w odchowie świń jest okres odsadzenia, wiąże się on z wystąpieniem istotnych zmian w fizjologii przewodu pokarmowego i mikroflory oraz funkcjonowaniem układu immunologicznego młodego zwierzęcia (Boudry i in., 2004). W trakcie odsadzenia, prosięta muszą poradzić sobie nie tylko z odstawieniem od matki, ale również ze zmianą diety na paszę stałą, zmianą środowiska, interakcjami z innymi prosiętami oraz próbą zaadoptowania się do nowej sytuacji (Lallès i in., 2007a). Problematyka zaburzeń w strukturze jelit odsadzonych prosiąt budzi zainteresowanie naukowców. Badania wykazały, że odsadzenie prowadzi do pogorszenia integralności jelit, zaburzeń procesów trawienia i wchłaniania oraz zwiększenia stresu oksydacyjnego (Campbell i in., 2019, 2013; Xiong i in., 2019). Czynniki te negatywnie wpływają na późniejszą wydajność zwierząt, a tym samym na opłacalność produkcji świń (Pluske i in., 2003). Zaburzenia przewodu pokarmowego wynikają nie tylko ze zmian w jego architekturze i funkcji, ale także z poważnych zmian w adaptującej się mikrobiocie jelitowej i odpowiedzi immunologicznej organizmu (Lallès i in.,

2007b). Ponadto, badania wskazują, że proces odsadzenia wpływa na parametry związane z budową histologiczną jelit, takie jak zanik kosmków i hiperplazja krypt (Pluske i in., 1997). Według badań Hampson (1986) u prosiąt odsadzonych w 21 dniu życia wystąpiło skrócenie kosmków o około 30% z jednoczesnym rozrostem głębokości krypt. Stan ten utrzymywał się przez około 7 dni po odsadzeniu. Sugeruje to, że pierwsze dni po odsadzeniu są niezwykle istotne dla prosienia i decydują o jego dalszych losach. Krytycznym momentem w odchowie prosiąt jest czas, w którym odsadzone prosienka zaczynają przyjmować wyłącznie stały pokarm. Badania donoszą, że około 50% odsadzonych prosiąt spożywa pierwszą paszę w ciągu 24 godzin po odsadzeniu, ale u około 10% odsadzonych głódówka utrzymuje się do 48 godzin (Brooks i Tsourgiannis, 2003). Taki okres niejedzenia może prowadzić do problemów zdrowotnych i wpływać na morfologię przewodu pokarmowego. Udowodniono, że głównym czynnikiem ograniczającym produkcyjność zwierząt bezpośrednio po odsadzeniu jest opóźnienie rozpoczęcia karmienia i ograniczone spożycie pokarmu stałego w tygodniu następującym po odsadzeniu (Worobec i in., 1999). Ponadto, okres głodu w połączeniu z brakiem obecności matki, negatywnie wpływa na zdolność prosiąt do utrzymania prawidłowej termoregulacji. Zjawisko to znajduje odzwierciedlenie w zmianach zarówno behawioralnych, jak i fizjologicznych (Hay i in., 2001). Utrzymanie prawidłowej funkcji jelit zależy między innymi od ciągłego procesu regeneracji nabłonka jelitowego. Wang i in. (2022a) stwierdzili, że w ciągu pierwszych 7 dni po odsadzeniu w jelicie czczym dochodzi do intensywniejszego złuszczenia komórek nabłonka, a jednocześnie obserwuje się spadek liczby komórek proliferujących. Skrócenie kosmków jelitowych może być skutkiem zwiększonego złuszczenia i obniżonej proliferacji komórek, co skutkuje także zmniejszeniem liczby enterocytów. Zmiany te ustępują do około 14. dnia po odsadzeniu. W pierwszym tygodniu po odsadzeniu dochodzi również do zmniejszenia liczby komórek kubkowych w kosmkach i kryptach dwunastnicy oraz jelita czczego, co jest powiązane z modyfikacjami w ekspresji mRNA *Muc2* i *NGN3*. Zwiększa ekspresja *NGN3* może wskazywać na wzrost liczby enterocytów, co z kolei może prowadzić do redukcji liczby komórek kubkowych. Z kolei, w jelicie krętym największa liczba komórek kubkowych występuje w pierwszym dniu po odsadzeniu, co może pełnić funkcję ochronną, zabezpieczając przed zaburzeniami mikrobiologicznymi poprzez wydzielanie śluzu (Wang i in., 2022a).

Kolejnym ważnym aspektem w prawidłowym funkcjonowaniu jelit jest bariera utworzona m.in. z białek połączeń ścisłych (TJ). Białka TJ, składające się z białek transbłonowych (okludyna i klaudyna) oraz białek cytoplazmatycznych (*zonula occludens*),

zamykają przestrzeń parakomórkową pomiędzy komórkami, kontrolując przepuszczalność przez warstwę nabłonka. Zwiększenie przepuszczalności jelit może powodować reakcje zapalne, umożliwiając wnikanie toksyn, związków alergennych lub bakterii (Arrieta i in., 2006; Asmar i in., 2002). Odsadzenie prosiąt zaburza funkcjonowanie bariery międzykomórkowej, a badania pokazują, że odsadzenie na wczesnym etapie życia (przed ukończeniem 3 tygodnia) ogranicza aktywne wchłanianie składników odżywcznych, co sugeruje, że proces odstawienia od matki może negatywnie wpływać na integralność bariery jelitowej (Wijtten i in., 2011). Skutki odsadzenia wpływają również na funkcjonowanie innych narządów, w tym wątroby, która jest szczególnie wrażliwa na stres oksydacyjny, charakterystyczny dla tego etapu życia prosiąt. Dodatkowo, ponieważ krew z jelit przepływa do wątroby przez żyłę wrotną, zaburzona funkcja jelit i zwiększoną przepuszczalność międzykomórkową mogą prowadzić do translokacji metabolitów i patogenów, co dodatkowo obciąża wątrobę i może upośledzać jej funkcje (Luo i in., 2016; Seki i Schnabl, 2012). Choć wątroba odgrywa kluczową rolę w metabolizmie i detoksykacji, istnieje stosunkowo niewiele badań skupiających się na jej podatności na zaburzenia związane ze stresem oksydacyjnym w okresie odsadzenia (Luo i in., 2016).

W celu usprawnienia funkcjonowania przewodu pokarmowego oraz zapobiegania zahamowaniu wzrostu, które mogą wystąpić w czasie odsadzenia, istotne jest opracowanie efektywnych strategii żywieniowych. Podstawą prawidłowego żywienia prosiąt są dobrej jakości, łatwostrawne surowce paszowe, o wysokiej zawartości białka cechującego się optymalnym składem aminokwasowym i dobrze przyswajalnej energii. Ponadto, stale poszukuje się nowych dodatków paszowych, które wspomagałyby rosnący organizm niwelując problemy zdrowotne związane z okresem okołoadsadzeniowym.

2.2. Krajowe źródła białka paszowego

Zwierzęta monogastryczne, w tym głównie świnie, potrzebują w żywieniu pasz białkowych o wysokiej wartości biologicznej, która determinowana jest składem aminokwasowym. Optymalnym składem aminokwasowym i wysoką strawnością charakteryzują się pasze białkowe pochodzenia zwierzęcego, jak mleko czy serwatka, jednakże ze względu na wysoką cenę wykorzystywane są jedynie w żywieniu najmłodszych prosiąt. Jednym z najbardziej popularnych surowców białkowych wykorzystywanych do produkcji mieszanek paszowych jest poekstrakcyjna śruta sojowa, która jest importowana do Polski przede wszystkim z krajów Ameryki Południowej. Pochodzi ona głównie z nasion soi genetycznie modyfikowanej (GMO). Obawy części konsumentów przed stosowaniem pasz pochodzących z upraw GMO zmuszają

naukowców do znalezienia alternatyw dla tego surowca (Grela, 2022). Ponadto, szybko rosnąca populacja ludzi i ich wzrastające zapotrzebowanie na produkty pochodzenia zwierzęcego zwiększą dodatkowo zapotrzebowanie na pasze białkowe (Nadathuri in., 2017). Od kilku lat prowadzone są działania mające na celu zwiększenie wykorzystania krajowych źródeł białka oraz zmniejszenie deficytu białka paszowego poprzez intensyfikację jego pozyskiwania z zasobów rodzimych. Działania te są wspierane również przez politykę perspektywiczną Unii Europejskiej na lata 2023-2035, która przewiduje znaczącą zmianę w użytkowaniu gruntów - ze zbóż na rośliny bobowate, w tym soję. Wśród krajowych surowców białkowych pochodzenia roślinnego wymienić można nasiona łubinu, grochu, bobiku oraz soi. W Instytucie Zootechniki PIB przeprowadzono badania nad alternatywnymi źródłami białka, takimi jak nasiona roślin bobowatych, czy produkty uboczne takie jak makuchy rzepakowe czy suszone wywary gorzelniane DDGS. Wyniki badań wykazały, że surowce te mogą jedynie częściowo zastąpić poekstrakcyjną śrutę sojową. Ograniczenia wynikają min. z obecności substancji antyżywieniowych, które negatywnie wpływają na strawność, a tym samym ograniczają przyswajalność białka i innych składników odżywcznych zawartych w tych paszach (Hanczakowska i in., 2019, 2017; Hanczakowska i Świątkiewicz, 2014) W doświadczeniu przeprowadzonym w ostatnim czasie, opisywanym w niniejszej Rozprawie Doktorskiej jako główne źródło białka paszowego stosowano makuch sojowy - produkt z ekstrudowanych nasion krajowej soi odmiany Viola poddanych następnie tłoczeniu (Świątkiewicz i in., 2021). Nasiona soi mogą być wykorzystywane w żywieniu różnych gatunków zwierząt gospodarskich, jednakże surowe zawierają związki antyżywieniowe, m.in. inhibitory trypsyny, lektyny i białka alergenne i nie mogą być dodane do paszy bez wcześniejszego przygotowania. Do zabiegów mających na celu zminimalizowanie zawartości związków antyżywieniowych w nasionach soi można zaliczyć przede wszystkim techniki baro-termiczne, które unieczyniają większość substancji antyżywieniowych, w tym inhibitory proteaz. Zabiegi te zwiększą dostępność skrobi, strawność białka i innych składników pokarmowych (Vagadia i in., 2017). Wpływają również na poprawę smakowitości nasion sojowych (Vagadia i in., 2017; Witaszek i in., 2020). Dodatkowo, wytłoczenie oleju z ekstrudowanych nasion soi pozwala na uzyskanie materiału paszowego (makucha) o wyższej zawartości białka i niższej zawartości tłuszcza, co jest korzystniejsze do stosowania w żywieniu prosiąt.

Interesującym białkowym materiałem paszowym, dostępnym w naszym kraju od kilku lat, są mączki z suszonych larw owadów, zgodnie z krajowym ustawodawstwem (Dz.U. L 295 z 18.8.2021) definiowane jako przetworzone białko zwierzęce. Ze względu na ograniczoną dostępność gruntów rolnych i konkurencję o źródła białka między żywnością dla ludzi, karmą

dla zwierząt domowych i paszą dla zwierząt gospodarskich, badane są alternatywne metody produkcji białka, a hodowla owadów wyłania się jako obiecująca opcja (Hong i Kim, 2022). Jednym z najpopularniejszych i najbardziej efektywnych owadów wykorzystywanych do produkcji mączek są larwy muchy *Hermetia illucens* (HI), między innymi z powodu możliwości utrzymywania ich w dużym zagęszczeniu oraz wysokiemu współczynnikowi biokonwersji. Dzięki temu do ich produkcji można wykorzystywać biomasę organiczną, w tym produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego. Sprzyja to bardziej efektywnemu zarządzaniu zasobami składników odżywczych, zarówno organicznych, jak i nieorganicznych, ze szczególnym uwzględnieniem azotu i fosforu (Elsayed i in., 2022). Produkcja owadów jest przyjazna dla środowiska ze względu na minimalny ślad ekologiczny, niewielkie zużycie wody, szybki wzrost i tempo reprodukcji. Mączka z larw HI charakteryzuje się dużą zmiennością zależną m.in. od gatunku owadów, sposobu ich żywienia, czy też stopnia przetworzenia mączki. Według danych literaturowych (Lu i in., 2022) można wskazać pewne granice zawartości białka - od 42 do 56%, zawartość tłuszcza (uzależniona jest od stopnia odłuszczenia mączki) waha się od 7% do 28%, natomiast włókna surowego od 9% do 12%. Mączka jest bogata w aminokwasy, w tym leucynę (26,2 g/kg), lizynę (21,6 g/kg) oraz fenyloalaninę z tyrozyną (36,2 g/kg; Lu i in., 2022).

2.3. Wybrane dodatki paszowe jako stymulatory wzrostu i zdrowia prosiąt

Modulowanie zdrowia i funkcjonalności błony śluzowej przewodu pokarmowego świń, poprzez różne strategie żywieniowe, może zmniejszyć występowanie chorób, a w konsekwencji ograniczyć stosowanie antybiotyków. Prosięta odsadzone charakteryzują się słabą przyswajalnością składników pokarmowych i nieukształtowaną mikrobiotą jelitową, a dodatki paszowe mogą być stosowane w celu zapobiegania chorobom układu pokarmowego i poprawy wskaźników produkcyjnych (Ferronato i Prandini, 2020). Wśród najważniejszych funkcji dodatków paszowych można wskazać wspieranie potrzeb żywieniowych i zdrowotnych zwierząt, w tym korzystne kształtowanie środowiska treści pokarmowej i flory jelitowej oraz poprawię strawności składników pokarmowych. Powinny również pozytywnie wpływać na status oksydacyjny organizmu, trwałość paszy i jakość produktów zwierzęcych. Dodatkowo mogą wykazywać działanie kokcydiostatyczne lub histomonostatyczne. Do najważniejszych dodatków paszowych dla świń zalicza się regulatory kwasowości, prebiotyki, probiotyki, enzymy paszowe, dodatki fitogeniczne, dezaktywatory mykotoksyn, a także przeciwtleniacze.

2.3.1. Mączka z larw muchy *Hermetia illucens*

Mączka owadzia jest materiałem paszowym, który poza swoją rolą jako pasza białkowa (przetworzone białko zwierzęce), stanowi również bogate źródło składników o wartości nie tylko odżywczej, ale także prozdrowotnej (Lu i in., 2022). Obiecująca pod względem poprawy stanu zdrowia zwierząt jest obecność w larwach owadów substancji bioaktywnych, takich jak chityna, peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP) i kwasy tłuszczyce. Wśród kwasów tłuszczyce najważniejszy jest kwas laurynowy (LA), który dominuje wśród kwasów obecnych w larwach *Hermetia illucens*. Wykazuje on właściwości immunostymulujące i przeciwpalne (Kaczor i in., 2022). Dodatkowo posiada działanie antybakteryjne oraz jest efektywnie wchłaniany przez wątrobę jako źródło energii (Lieberman i in., 2006). Ponadto, LA jest również szeroko stosowany jako surowiec w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym (Suryati i in., 2023), jest wykorzystywany podczas produkcji leków do zwalczania infekcji wirusowych, w tym niektórych rodzajów grypy, opryszczki wargowej, zapalenia oskrzeli, infekcji drożdżakowych, rzeżączki, opryszczki wywołanej przez wirus HSV, HIV/AIDS (Enig, 2017), infekcji jelitowych wywołanych przez pasożyta *Giardia lamblia* i grzybicy. Co więcej, LA wykazuje działanie przeciwbakteryjne przeciwko bakteriom Gram-dodatnim: *S. aureus*, *B. megaterium*, *Pneumococci* sp. i *Corynebacterium* sp. i bakteriom Gram-ujemnym: *H. pylori*, *C. trachomatis* i *N. gonorrhoeae* (Bergsson i in., 1999, 1998; Galbraith i in., 1971; Kabara i in., 1972; Sun i in., 2003). Z kolei, chityna, polisacharyd występujący w pancerzu larw, wykazuje właściwości prebiotyczne, co zwiększa wartość mączki jako dodatku do paszy (Kierończyk i in., 2022; Reátegui i in., 2020). Większość badań wskazuje, że chityna jest odporna na trawienie i wchłanianie w jelcie cienkim zwierząt monogastrycznych. Przechodzi do jelita grubego, gdzie mikrobiota wykorzystuje ją jako fermentowalny substrat (Han i in., 2007). Badania na proszettach wykazały, że pochodne chityny, takie jak chitozan, mogą potencjalnie ograniczać lub hamować rozwój patogennych bakterii wywołujących biegunkę po odsadzeniu (Xu i in., 2020; Yu i in., 2020). Stanowi to obiecującą perspektywę do hamowania tego schorzenia w tym newralgicznym momencie.

Za niezwykle cenne związki należy uznać peptydy antybakteryjne (AMP), które stanowią główny mechanizm obronny u larw owadów i zwiększają ich odporność na zakażenia bakteryjne (Hoffmann i Hetru, 1992), dzięki czemu mogą stanowić alternatywną opcję dla antybiotyków w medycynie weterynaryjnej (Elhag i in., 2017). Integralnym dopełnieniem niniejszej Rozprawy Doktorskiej jest publikacja przeglądowa (**Publikacja 4**), dostarczająca szczegółowego omówienia kluczowych związków biologicznych występujących w larwach

Hermetia illucens – biomolekuł AMP. Są one szczególnie interesujące ze względu na ich szerokie spektrum aktywności. AMP syntetyzowane są przez owady w ciele tłuszczowym, a następnie są uwalniane do hemolimfy (Bulet i in., 1999; 2005). To ewolucyjne konserwatywnie biocząsteczki, (Ebenhan i in., 2014), które charakteryzują się selektywną cytotoksycznością, co umożliwia im skuteczne zwalczanie patogennych mikroorganizmów bez szkody dla komórek gospodarza. Mechanizm działania AMP wynika z różnic strukturalnych pomiędzy komórkami gospodarza a patogenami (Ebenhan i in., 2014). W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat udało się wyizolować i scharakteryzować wiele AMP, które zostały sklasyfikowane według sekwencji aminokwasowej i struktury na trzy grupy: (1) cekropiny, (2) defensyny oraz (3) peptydy bogate w reszty proliny i/lub glicyny (Lata i in., 2007). Do najważniejszych AMP pochodzących od owadów należą cekropiny, defensyny, attacyny, dipterycyny, drosomycyny, ponerycyny i metchnikoviny (Mylonakis i in., 2016; Wu i in., 2018). Badania nad AMP pochodzącymi od HI doniosły, że owad ten wykazuje ekspresję ponad 50 genów kodujących przypuszczalne AMP (Van Moll i in., 2022). Uważa się, że jest to ściśle powiązane ze środowiskiem, w którym żyje (Müller i in., 2017). Ich działanie bateriostatyczne i bakteriobójcze możliwe jest dzięki specyficznym oddziaływaniom elektrostatycznym pomiędzy aminokwasami AMP a ujemnie naładowanymi cząsteczkami na powierzchni mikroorganizmów, które pozwala na wiązanie się peptydów z błonami bakteryjnymi (Moretta i in., 2020; Zhang i in., 2021). Działanie AMP polega głównie na formatowaniu kanałów jonowych bądź porów transmembranowych co prowadzi do zniszczenia patogennej komórki, a ich głównymi celami są lipidy błonowe bakterii (Józefiak i in., 2016). Ze względu na rosnące problemy z antybiotykoopornością wielu bakterii, peptydy mogą być jedną z alternatyw zarówno w weterynarii, jak i medycynie ludzkiej. AMP mogą być szczególnie istotne w zwalczaniu gronkowca złocistego opornego na metycylinę (MRSA) (Park i in., 2015; Park i Yoe, 2017). Oprócz roli immunologicznej, AMP są również zaangażowane w utrzymywanie i kształtowanie społeczności bakterii jelitowych HI (Vogel i in., 2018). Omówione w publikacji przeglądowej (**P4**) prace naukowe uzupełniają badania przeprowadzone w ramach Rozprawy Doktorskiej, podkreślając wartość AMP z mączki z larw *Hermetia illucens* i wskazując na zasadność traktowania tego materiału jako innowacyjnego i skutecznego dodatku paszowego. Opisywane badania pokazują, że mączka HI poprawia zdrowie jelit u zwierząt poprzez modulację mikrobioty jelitowej i redukcję szkodliwych drobnoustrojów, wzmacnianie odporności i zmniejszanie stanu zapalnego (Sultana i in., 2022). Doświadczenia przeprowadzone na świach wykazały, że suplementacja mączką zwiększyła liczbę pożytecznych bakterii i poziom cytokin przeciwzapalnych, jednocześnie redukując szkodliwe

metabolity bakteryjne (Tang i in., 2022). Badania przeprowadzone na kurach nioskach i kuropatwach berberyjskich wykazały, że diety z mączką owadzią poprawiają odporność na choroby, co odzwierciedlają markery odpowiedzi immunologicznej, takie jak stosunek albuminy do globuliny (Marono i in., 2017; Loponte i in., 2017; Bovera i in., 2018). W badaniach Biasato i in. (2019b) suplementacja paszy dla drobiu 5% dodatkiem mączki HI poprawiła zdrowie jelit, ale wyższe dawki (15%) miały negatywne skutki. Z kolei, u świń dodatek mączki HI zmniejszył biegunkę i regulował mikrobiotę jelitową oraz ekspresję cytokin (Tang i in., 2022). Podsumowując zebrane dane literaturowe można stwierdzić, że stosowanie mączki z larw HI jest obiecujące nie tylko jako zrównoważona i korzystna pod względem odżywczym alternatywa dla tradycyjnych pasz białkowych dla zwierząt gospodarskich, ale także jako dodatek paszowy poprawiający zdrowie świń poprzez modulowanie mikrobioty jelitowej i wskaźników immunologicznych. Jednakże optymalne poziomy mączki HI w diecie nie są dokładnie określone. W doświadczeniach stanowiących istotę tej Rozprawy Doktorskiej, używana była pełnotusta mączka z larw HI jako dodatek, w ilości 2,5% lub 5%. Zawartość białka surowego wynosiła 426 g/kg, tłuszczu surowego 264 g/kg, włókna surowego 91 g/kg, a popiołu 85 g/kg.

2.3.2. Astaksantyna

Istotnym dodatkiem paszowym rozpatrywanym w niniejszej Rozprawie Doktorskiej są antyoksydanty. Analizując profil kwasów tłuszczych makuchu z nasion soi można stwierdzić, że ponad 80% stanowią kwasy nienasycone, a większość z nich to kwasy tłuszcze wielonienasycone. Znana jest podatność tych kwasów na utlenianie, które powoduje jełczanie tłuszczu paszy, negatywnie wpływa na zdrowie zwierząt, a także na jakość oraz trwałość mięsa i tłuszczu, zwiększając podatność tych produktów na utlenianie i psucie się w czasie przechowywania (Medic i in., 2014; Muhammad i in., 2020). Stąd też, dobrą praktyką jest zastosowanie przeciwtleniaczy w celu zabezpieczenia pasz zawierających znaczne ilości tego rodzaju tłuszczu.

Wyniki badań wykazały, że wczesne odsadzanie może powodować dyshomeostazę statusu redoks u prosiąt (Buchet i in., 2017; Yin i in., 2014). W doświadczeniach przeprowadzonych przez Luo i in. (2016) oraz Zhu i in. (2012) stwierdzono, że stres oksydacyjny wywołany odsadzeniem znacząco przyczynia się do uszkodzeń jelit i wątroby. W warunkach homeostazy organizmu, równowaga redoks jest utrzymywana poprzez działanie reakcji utleniających i antyoksydacyjnych. Kiedy ta równowaga zostaje zakłócona, reaktywne formy tlenu (ROS), takie jak anion ponadtlenkowy (O^{2-}), nadtlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodnik

hydroksylowy ($\cdot\text{OH}$), zaczynają się nadmiernie gromadzić. ROS pełnią istotną rolę w sygnalizacji komórkowej, jednak ich nadmiar jest toksyczny dla białek, lipidów i DNA (Stanley i in., 2019). Stres oksydacyjny uznaje się za jeden z kluczowych czynników ograniczających zdrowie i rozwój prosiąt odsadzonych (Luo i in., 2016; X. Tang i in., 2022). Wątroba jest wyjątkowo wrażliwa na wpływ ROS, które powstają zarówno podczas procesów metabolicznych, jak i biotransformacji ksenobiotyków. Badania pokazują, że w okresie odsadzenia obserwuje się hamowanie rozwoju wątroby, osłabienie jej funkcji antyoksydacyjnych i wzrost poziomu ROS, co z kolei wywołuje apoptozę i autofagię komórek tego narządu (Allameh i in., 2023; Mooli i in., 2022). Stres oksydacyjny odgrywa również rolę w patogenezie wielu chorób związanych z uszkodzeniem wątroby (Chen and Kotani, 2016), pośredniczy m.in. w progresji zwłóknienia wątroby, a ROS mogą pełnić funkcję mediatorów procesów molekularnych i komórkowych związanych z rozwojem zwłóknienia wątroby (Sanchez-Valle i in., 2012). Zważając na powyższe, stosowanie antyoksydantów w dawce pokarmowej może chronić narządy, w tym głównie wątrobę przed negatywnymi skutkami stresu oksydacyjnego.

Kluczowym dodatkiem stosowanym w badaniach wchodzących w skład niniejszej Rozprawy Doktorskiej jest silny przeciutleniacz – astaksantyna (AST). Astaksantyna (3,3'-dihydroksy- β,β -karoten-4,4'-dion) należy do grupy karotenoidów ksantofilowych i jest naturalnie występującym antyoksydantem (Choi i in., 2011). Właściwości przeciutleniające AST analizowano dwiema metodami, tj. FRAP (ang. *ferric ion reducing antioxidant parameter*) i 2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl (DPPH). Obie metody potwierdziły silną aktywność przeciutleniającą AST: DPPH - 91% zahamowania rodników, FRAP - 298,34 $\mu\text{m TE/g}$ (Szczepanik i in., 2024 (P2)). Właściwości przeciutleniające AST przewyższają właściwości innych, podobnych związków. Jej aktywność jest 14-krotnie większa niż witamina E, 54-krotnie wyższa niż β -karotenu i aż 65-krotnie przewyższa witaminę C (Igielska-Kalwat i in., 2015). Według Miki (1991) astaksantyna działa dziesięć razy silniej niż zeaksantyna, luteina, kantaksantyna czy β -karoten, a jej potencjał antyoksydacyjny jest 100 razy większy niż α -tokoferolu. Z perspektywy technologii produkcji pasz szczególnie istotny jest fakt, że AST cechuje się większą odpornością na działanie światła i wysokich temperatur w porównaniu do innych karotenoidów (Pogorzelska i in., 2016). Podczas wchłaniania w przewodzie pokarmowym AST łączy się z kwasami żółciowymi, tworząc micle, które ułatwiają jej transport przez nabłonek jelitowy, następnie zostaje włączona do chylomikronów, a po ich metabolizmie w układzie limfatycznym i krwiobiegu, jest transportowana w połączeniu z lipoproteinami do różnych tkanek organizmu (Ekpe i in., 2018). Tam pełni funkcję ochronną,

zabezpieczając komórki przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Jej silne właściwości przeciwwietleniące wynikają z obecności łańcucha polienowego z wieloma wiązaniami podwójnymi, które skutecznie neutralizują tlen singletowy oraz wolne rodniki, przerywając reakcje oksydacyjne. Jej zdolności antyoksydacyjne wynikają również z chemicznych i fizycznych interakcji z błonami komórkowymi, gdzie wychwytuje wolne rodniki, stabilizując strukturę błony i zapobiegając jej uszkodzeniom (Ekpe i in., 2018). Zgodnie z najnowszymi badaniami, AST wykazuje pozytywny wpływ na zdrowie wątroby, głównie dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym. Pomaga w regulacji układu odpornościowego i procesów metabolicznych, a także wspomaga regenerację wątroby w przypadku uszkodzeń, takich jak bliznowacenie, odkładanie się tłuszcza, nowotwory czy toksyczność wywołana lekami (Arefpour i in., 2024). Według najnowszych doniesień, astaksantyna może regulować metabolizm tryptofanu poprzez modyfikację mikrobioty jelitowej i zwiększenie poziomu metabolitów indolu (Ren i in., 2025). Z kolei, doświadczenie wykonane na lochach wykazało, że dodatek AST znacznie zwiększył liczbę żywych urodzeń i średni dzienny przyrost masy ciała prosiąt ze znaczną poprawą angiogenezy łożyska i statusu rozwoju dwunastnicy u prosiąt. Oznacza to, że karotenoid ten może przechodzić przez łożysko lub mleko, co może poprawić wyniki reprodukcyjne lochy i wzrost prosiąt poprzez zmniejszenie stresu oksydacyjnego w późnej ciąży i w trakcie trwania laktacji (Qin i in., 2024).

3. Hipotezy badawcze

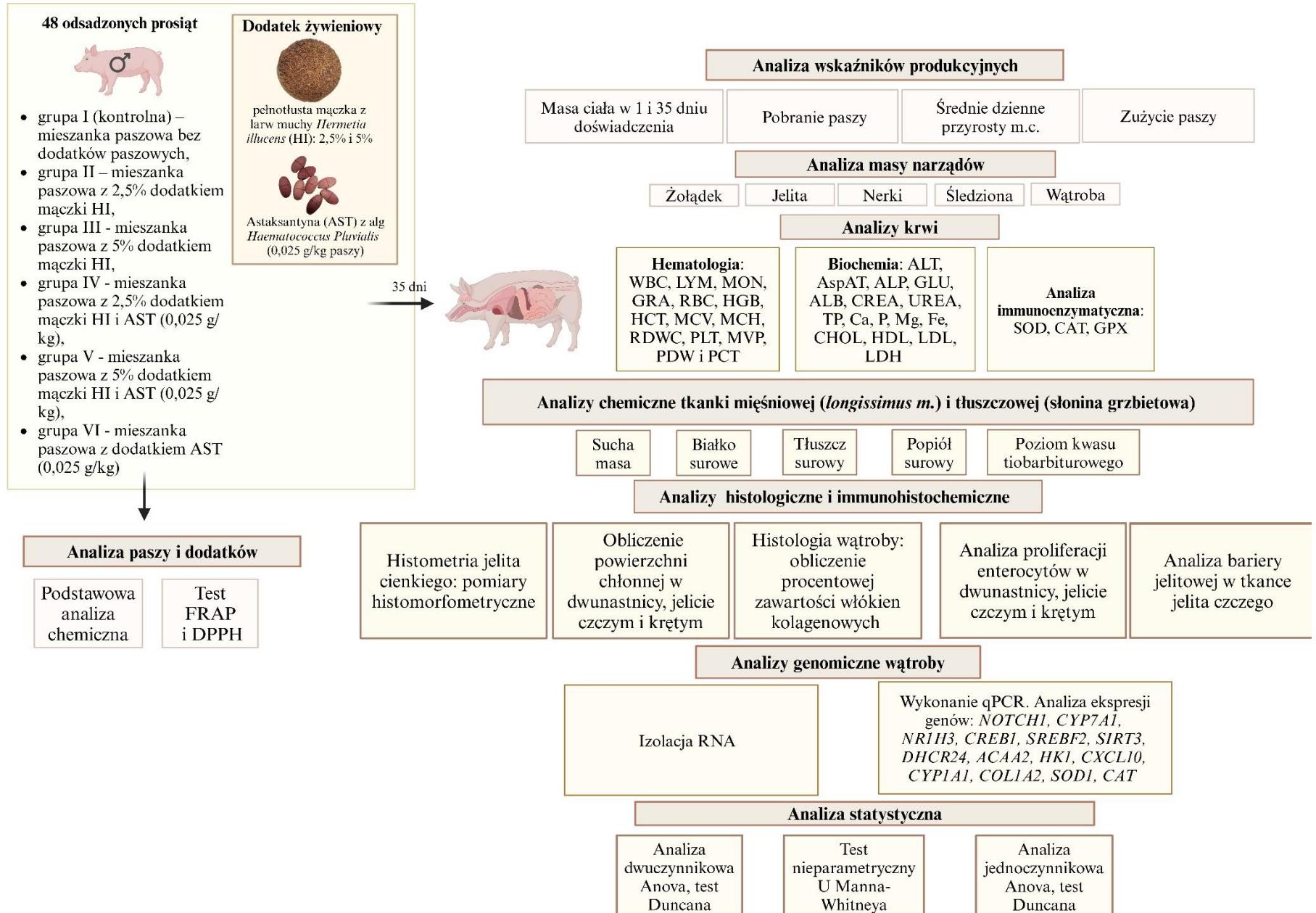
H1. Bioaktywne substancje zawarte w mączce z larw *Hermetia illucens*, dzięki swoim właściwościom bakteriobójczym i prebiotycznym, mogą korzystnie wpływać na status zdrowotny i produkcyjność młodych zwierząt.

H2. Mączka z larw *Hermetia illucens* charakteryzuje się wysoką jakością białka i dobrą strawnością składników pokarmowych, co powinno wspierać optymalne wskaźniki wzrostu i produkcyjności odsadzonych prosiąt.

H3. Astaksantyna, ze względu na silne właściwości antyoksydacyjne, może wspomagać utrzymanie równowagi oksydacyjnej organizmu i poprawiać jego ogólny status zdrowotny.

4. Cel badań

Celem naukowym badań było określenie wpływu mieszanki paszowej, wzbogaconej w naturalne substancje immunostymulujące pochodzące z mączki z larw muchy *Hermetia illucens* i astaksantyny, na rozwój przewodu pokarmowego, wskaźniki produkcyjne oraz status zdrowotny prosiąt.



Rycina 1. Metodyka ogólna doświadczenia

5. Materiał i metody

Prace badawcze prowadzone w ramach doktoratu były podzielone na dwa główne etapy (Rycina 1): **etap 1)** doświadczenie wzrostowe na zwierzętach oraz **etap 2)** analizy próbek materiału biologicznego pobranego od zwierząt.

5.1. Metodyka badań - Etap 1

Na wszystkie zaplanowane w doświadczeniu procedury badawcze obejmujące wykorzystanie żywych zwierząt (Uchwała nr 420/2020 z dnia 22 lipca 2020 r.) uzyskano zgodę I Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie.

Doświadczenie wzrostowe przeprowadzono na 48 prosiątkach rasy polska biała zwisłoucha (PBZ), kastrowanych samcach, odsadzonych w wieku 35 dni. Świnie podzielono na 6 grup po 8 osobników w każdej. Zwierzęta utrzymywano indywidualnie w kojach. Mieszanki paszowe dla wszystkich grup były izoenergetyczne i izobiałkowe oraz pokrywały zapotrzebowanie na składniki pokarmowe i energię. Głównym źródłem białka we wszystkich mieszankach był makuch z nasion rodzimej soi odmiany Viola. Mieszanki dla poszczególnych grup różniły się obecnością i poziomem mączki owadziej pełnotłustej wytworzonej z larw muchy *Hermetia illucens* (HI; HiProMine S.A., Robakowo, Polska) oraz obecnością przeciwtleniacza – astaksantyny (AST) wytworzonej z alg *Haematococcus Pluvialis* (Podkowa AD 1905 sp. z oo, Lublin, Polska). Skład komponentowy oraz wartość pokarmową mieszanek paszowych przedstawiono w publikacji **P1**.

Układ doświadczenia na zwierzętach był następujący:

- grupa I (kontrolna) – mieszanka paszowa bez dodatków paszowych,
- grupa II – mieszanka paszowa z 2,5% dodatkiem mączki HI,
- grupa III - mieszanka paszowa z 5% dodatkiem mączki HI,
- grupa IV - mieszanka paszowa z 2,5% dodatkiem mączki HI i AST (0,025 g/kg),
- grupa V - mieszanka paszowa z 5% dodatkiem mączki HI i AST (0,025 g/kg),
- grupa VI - mieszanka paszowa z dodatkiem AST (0,025 g/kg).

Doświadczenie żywieniowe trwało 35 dni. Masę ciała zwierząt kontrolowano w 1 i 35 dniu doświadczenia, jak również obliczono pobranie paszy, średnie dzienne przyrosty masy ciała i zużycie paszy w okresie od 1 do 35 dnia doświadczenia (**P1**).

5.2. Metodyka badań - Etap 2

Po zakończeniu 35 dniowego okresu odchowu wszystkie zwierzęta zostały uśmiercone w celu pobrania próbek do dalszych pomiarów i analiz. Pobrano próbki krwi do oznaczenia wskaźników hematologicznych i biochemicznych (**P1**). Wypreparowano żołądek, jelita, wątrobę, nerki oraz śledzionę, które zostały zważone (**P1**). Zważono również poszczególne odcinki przewodu pokarmowego (**P1**). Próbki tkanki mięśniowej z mięśnia najdłuższego grzbietu (*longissimus m.*) i tłuszczowej (słonina grzbietowa) do analiz chemicznych pobrano z obszaru między ostatnim kręgiem piersiowym, a pierwszym kręgiem lędźwiowym (**P1**). Z odcinków jelita cienkiego (dwunastnica, czcze, kręte) pobrano wycinki tkanki do analiz histomorfometrycznych, immunohistochemicznych, w tym oznaczenia białek połączeń ścisłych (**P2**). Dodatkowo, przeprowadzono ocenę, na poziomie histologicznym oraz genomicznym, przeciwnieniającego wpływu AST na zdrowie wątroby odsadzonych prosiąt. W tym celu po uboju od zwierząt z grupy I i VI pobrano wycinek tkanki wątroby do analizy histologicznej oraz oznaczenia ekspresji wybranych genów związanych z rolą wątroby w metabolizmie lipidów (**P3**).

5.2.1. Analizy chemiczne paszy

Podstawowe analizy chemiczne próbek pasz przeprowadzono zgodnie ze standardowymi metodami (AOAC, 2009). Aktywność antyoksydacyjną analizowano przy użyciu dwóch testów: test z rodnikiem DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl) – metoda oparta na neutralizacji stabilnego rodnika przez antyoksydant, oraz test FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) – metoda oparta na redukcji jonów metali (Fe^{3+} do Fe^{2+}) przez antyoksydant (Benzie i Strain, 1996).

5.2.2. Analiza wskaźników hematologicznych krwi (P1)

Próbki pełnej krwi analizowano przy użyciu automatycznego analizatora hematologicznego Vet Mythic 18 (Orphée C2 Diagnostics, Francja). Ocenianymi parametrami były całkowita liczba: białych krwinek (WBC), limfocytów (LYM), monocytów (MON), granulocytów (GRA), czerwonych krwinek (RBC), a także zawartość hemoglobiny (HGB), hematokryt (HCT), średnia objętość krwinki czerwonej (MCV), średnia masa hemoglobiny erytrocycie (MCH), szerokość rozkładu czerwonych krwinek (RDWC), liczba płytek krwi (PLT) i ich średnia objętość (MVP), wskaźnik heterogeniczności wielkości płytek krwi (PDW) i hematokryt płytowy (PCT).

5.2.3. Analiza wskaźników biochemicznych krwi (P1)

Próbki krwi pobrane do oznaczania parametrów biochemicznych odwirowano ($3500 \times g$, 15 min, 4°C), aby uzyskać surowicę. Wskaźniki biochemiczne mierzone kolorometrycznie przy użyciu automatycznego analizatora biochemicznego BS-180 (Shenzhen Mindray Biomedical Electronics Co. Ltd., Shenzhen, Chiny) i zestawów testowych Cormay (Lublin, Polska). Oznaczono następujące parametry: aminotransferaza alaninowa (ALT), aminotransferaza asparaginianowa (AspAT), fosfataza alkaliczna (ALP), glukoza (GLU), albumina (ALB), kreatynina (CREA), mocznik (UREA), białko całkowite (TP), wapń (Ca), fosfor (P), magnez (Mg), żelazo (Fe), cholesterol całkowity (CHOL), lipoproteiny o dużej gęstości (HDL), lipoproteiny o małej gęstości (LDL), trójglycerydy (TG), dehydrogenaza mleczanowa (LDH).

5.2.4. Analiza immunoenzymatyczna (ELISA) enzymów związanych z ochroną antyoksydacyjną

Analizę stężenia w surowicy enzymów antyoksydacyjnych, w tym dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) oraz peroksydazy glutationowej (GPX), przeprowadzono przy użyciu zestawów ELISA firmy Bioassay Technology Laboratory (Szanghaj, Chiny), zgodnie z protokołem producenta.

5.2.5. Analiza chemiczna mięsa i słoniny (P1)

Podstawowe analizy chemiczne (sucha masa, białko surowe, thuszcz surowy i popiół surowy) próbek mięsa wykonano zgodnie ze standardowymi metodami (AOAC, 2009). Poziom kwasu tiobarbiturowego (TBARS) oznaczono w próbkach mięsa i słoniny po 3 miesiącach przechowywania w temperaturze -20°C , stosując zmodyfikowaną metodę zaproponowaną przez Pikul i in. (1989).

5.2.5. Analiza histomorfometryczna tkanki jelita cienkiego (P2) oraz analiza histologiczna tkanki wątroby (P3)

Próbki tkanki jelit i wątroby (lewy płat) utrwalono w 4% roztworze buforowanej formaliny (Idalia, Polska). Po utrwalaniu, próbki pocięto na dwa fragmenty o wielkości około 1 cm^3 i umieszczone w kasetach histologicznych. Kasetki umieszczone w procesorze tkankowym (Citadel 2000, Thermo Fisher Scientific), gdzie odwodniono je w rosnących stężeniach alkoholu (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 100%), zanurzono w ksylenie i zatopiono w parafinie (Idalia, Polska). Z każdej kasetki utworzono dwa bloczki parafinowe, a z każdego bloczka wykonano dwa preparaty mikroskopowe tnąc bloczek na skrawki o grubości 4 μm z wykorzystaniem mikrotomu (4 skrawki na szkiełko; Microm HM 340 E, Thermo Scientific,

Niemcy). Preparaty z tkanek jelit barwiono metodą Pas-Alcian (Elektromed, Polska), która umożliwia zliczanie komórek kubkowych. Wybarwione preparaty obserwowano pod mikroskopem świetlnym (Axio Lab.A1 Carl Zeiss, Oberkochen, Niemcy) wyposażonym w kamerę Olympus EP50 (Olympus, Tokio, Japonia). Zebrane obrazy mikroskopowe zostały zbadane przy użyciu następującego oprogramowania do analizy graficznej: EPview (Olympus, Tokio, Japonia) i ImageJ (wersja 1.53; US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA, dostępne na stronie: <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>, dostęp 15 maja 2023). W dwunastnicy, jelicie czzzym i jelicie krętym analizowano następujące parametry: szerokość błony śluzowej, długość kosmków (od końca kosmka do połączenia kosmek-krypta) i szerokość kosmków (mierzoną w połowie ich długości), głębokość krypt (długość wgłobienia między sąsiednimi kosmkami), szerokość krypt (mierzoną w połowie głębokości krypty), liczbę komórek kubkowych, i enterocytów na długości 100 µm w przekroju kosmka (w 2/3 długości całego kosmka mierzonej od jego podstawy), szerokość mięśniówki z rozróżnieniem na warstwę mięśnią podłużnych i okrężnych oraz stosunek długości kosmka do głębokości krypty. Zmierzono tylko pionowo zorientowane kosmki i krypty. Dla każdego osobnika wykonano 20 pomiarów błony śluzowej i mięśniowej oraz 15 pomiarów komórek kubkowych i enterocytów, długości i szerokości kosmków oraz głębokości i szerokości krypt. Obliczono również powierzchnię absorpcyjną dwunastnicy, jelita czzego i jelita krętego, zgodnie z metodą opisaną przez Kisielinskiego i in. (2002).

Preparaty wątroby barwiono techniką trójchromową Massona-Goldnera z błękitem anilinowym (Diapath S.P.A., Włochy) w celu rozróżnienia struktur kolagenowych. Zebrane obrazy mikroskopowe poddano badaniu przy użyciu oprogramowania Zen 2.3 blue edition (wersja 2.3; Carl Zeiss Microscopy, Jena, Niemcy) i ImageJ. Program ImageJ w wersji 1.53 został użyty do obliczenia procentowej zawartości włókien kolagenowych w 10 losowo wybranych obszarach zainteresowania (ROI) u każdego osobnika. Ilościowa ocena włóknienia wątroby zależała od rozróżniania kolorów pomiędzy niebieskim (włókna kolagenowe) i czerwonym (mięższ). Ilość włókien kolagenowych na obrazie oceniano przy użyciu funkcji Threshold (po ustaleniu 8-bitowej skali szarości). Wyniki podawano jako średnią procentową zawartość włókien kolagenowych dla poszczególnych osobników.

5.2.6. Analiza immunohistochemiczna tkanek jelita cienkiego (P2)

Ocenie proliferacji poddano wycinki z dwunastnicy, jelita czzego i krętego, a reprezentatywną próbkę jelita czzego do analizy wybranych białek połączeń ścisłych (TJ). Reakcje immunohistochemiczne dla Ki-67, klaudyny 5, klaudyny 1 i okludydyny

przeprowadzono po deparafinizacji w ksylenie i rehydratacji zmniejszonymi stężeniami etanolu. Indukowane ciepłem odzyskiwanie epitopów przeprowadzono w buforze cytrynianu sodu (10 mM cytrynian sodu, pH 6,0) przy użyciu urządzenia Rapid Cook (Morphy Richards, Swinton, Wielka Brytania). Następnie skrawki schłodzono do temperatury pokojowej i pięciokrotnie przepłukano buforem TBS, po czym szkiełka inkubowano w roztworze blokującym enzymy(endogenną peroksydazę, pseudoperoksydazę i alkaliczną fosfatazę; UltraCruz® Blocking Reagent, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Aby zablokować niespecyficzne miejsca wiązań przeciwciał, szkiełka inkubowano w 5% roztworze surowicy koziej (ab7481, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania) przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Szkiełka przepłukano trzykrotnie buforem TBS, po czym inkubowano w komorze wilgotnej z pierwszorzędowymi przeciwciałami przeciwko Ki67 (ab15580, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1:200), klaudynie 5 (AF5216, Affinity, Jiangsu, Chiny), klaudynie 1 (AF0127, Affinity, Jiangsu, Chiny) i okludynie (DF7504, Affinity, Jiangsu, Chiny) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Jako rozcieńczalnika dla przeciwciał użyto Emerald Antibody Diluent (Sigma, Merck Life Science, Kanada). Szkiełka płukano pięciokrotnie buforem TBS, a następnie inkubowano z przeciwciałem drugorzędowym Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab205718, Abcam, Cambridge, Wielka Brytania; rozcieńczenie 1:1500). Reakcję wizualizowano przy użyciu DAB Quanto (3 min; Epredia™ DAB Quanto Detection System; Montréal, Quebec, Kanada). Barwienie kontrastowe przeprowadzono przy użyciu hematoksyliny Mayera (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Immunoreakcja została zweryfikowana przy użyciu kontroli negatywnych poddanych identycznemu barwieniu immunohistochemicznemu, z wyłączeniem użycia przeciwciał pierwszorzędowych (Hułas-Stasiak i in., 2020). W przypadku reakcji z Ki-67 dla każdego osobnika wyznaczono pięć obszarów zainteresowania (ROI) w obrębie błony śluzowej, obejmujących wycinki kosmków i sąsiednich krypt. W każdym ROI liczbę komórek dodatnich w kryptach (ulegających proliferacji) liczono za pomocą wtyczki Cell Counter w programie ImageJ (na podstawie (Vega-López i in., 1993). Do analizy białek połączeń ścisłych wybrano osiem obszarów zainteresowania w nabłonku kosmków dla każdego zwierzęcia. ROI miały takie same wymiary na każdym analizowanym obrazie w obrębie każdego zwierzęcia i grupy. IHC Profiler (wtyczka ImageJ) umożliwia ilościową ocenę intensywności barwienia IHC w preparatach zapewniając obiektywną analizę wyników. Działanie wtyczki opiera się na metodzie dekonwolucji koloru umożliwiając oddzielenie sygnałów barwnika (DAB i hematoksylin) w celu precyzyjnej oceny reakcji (Seyed Jafari and Hunger, 2017; Varghese i in., 2014). Wynik jest wyświetlany w sposób półilościowy

i wykorzystywany do obliczeń gęstości optycznej IHC (Seyed Jafari and Hunger, 2017; Varghese i in., 2014).

5.2.7. Izolacja RNA i ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR) w tkance wątroby (P3)

Izolację RNA z próbek wątroby (lewy płat) przeprowadzono przy użyciu Total RNA Mini (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta. Jakość RNA oceniano przy użyciu Tapestation 2200 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), a jego ilość mierzono przy użyciu Nanodrop 2200 (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Do oczyszczania RNA wykorzystano RNAClean XP (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Po oczyszczeniu jakość RNA oceniano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym. Następnie RNA poddano odwrotnej transkrypcji przy użyciu zestawu High Capacity cDNA Archive Kit (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Następnie wykonano qPCR przy użyciu testów ekspresji genów TaqMan: *NOTCH1 Ss03377164_u1*, *CYP7A1 Ss03378689_u1*, *NR1H3 Ss03389237_g1*, *CREB1 Ss03386122_u1*, *SREBF2 Ss03376492_u1*, *SIRT3 Ss03386766_u1*, *DHCR24 Ss04323966_m1*, *APOE Ss03394681_m1*, *ACAA2 Ss04245775_m1*, *HK1 Ss04323446_m1*, *CXCL10 Ss03391845_g1*, *CYP1A1 Ss03394917_g1*, *COL1A2 Ss03375009_u1*, *SOD1 Ss03373476_u1* i *CAT Ss04323025_m1*. Proces przeprowadzono trzykrotnie przy użyciu QuantStudio 7-flex (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) z wykorzystaniem TaqMan Gene Expression Master Mix. Jako kontrolę endogenną użyto *RPS29 Ss03391548_g1*.

5.2.8. Analizy statystyczne

Dane dotyczące **masy ciała zwierząt, pobrania paszy, średnich dziennych przyrostów masy ciała i zużycie paszy, analizy chemicznej mięsa i słoiny, wyników hematologicznych i biochemicznych (P1) oraz analiz histologicznych i immunohistochemicznych (P2)** analizowano za pomocą dwuczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) przy użyciu oprogramowania Statistica® ver. 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) i programu GraphPad Prism wersja 10.0.2 dla Windows (GraphPad Software). Wyniki opisano jako średnia ± błąd standardowy średniej (SEM). Model obejmował dwa główne czynniki: (1) udział mączki z larw *Hermetia illucens* (0%, 2,5% lub 5%) oraz (2) obecność astaksantyny w mieszanicy paszowej (- lub +), a także ich interakcje. Każde proszę stanowiło jednostkę eksperymentalną ($n = 8$ na grupę). Przed analizą wariancji normalność rozkładu danych oceniono za pomocą testu Shapiro-Wilka oraz na podstawie histogramów a jednorodność wariancji sprawdzono testem

Browna-Forsythe'a. W przypadku istotnych różnic ($P < 0,05$) do porównania średnich zastosowano test Duncana.

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \delta_{ijk}$$

gdzie:

- Y_{ijk} – wartość zmiennej zależnej dla k-tego prosienia w grupie z i-tym poziomem czynnika α oraz j-tym poziomem czynnika β ,
- μ – wartość średnia (stała),
- α_i – efekt i-tego poziomu czynnika α (udział mączki *Hermetia illucens*: 0%, 2,5% lub 5%),
- β_j – efekt j-tego poziomu czynnika β (obecność astaksantyny: tak (+) vs nie (-)),
- $(\alpha\beta)_{ij}$ – efekt interakcji pomiędzy czynnikami α i β ,
- δ_{ijk} – błąd losowy dla k-tego prosienia.

Wyniki **analizy ekspresji genów** analizowano za pomocą nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya (**P3**). Dane dotyczące **procentowego udziału włókien kolagenowych** oraz **analizy immunoenzymatycznej enzymów antyoksydacyjnych** oceniano przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a przy $P < 0,05$ wykonywano testy post-hoc Duncana (P3). Dane dotyczące procentowego udziału włókien kolagenowych przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe (SD), a związane z analizą ekspresji genów przedstawiono jako średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM). Wszystkie analizy przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania Statistica® ver. 13.3 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Model eksperymentalny obejmował dwie grupy: Grupę I (kontrolną) oraz Grupę VI (z astaksantyną, AST). Każde prosień traktowano jako indywidualną jednostkę doświadczalną ($n = 8$ świń na grupę).

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

gdzie:

- Y_{ij} – wartość zmiennej zależnej dla j-tej obserwacji w i-tej grupie,
- μ – ogólna średnia,
- τ_i – efekt i-tego poziomu czynnika (Grupa I vs. Grupa VI),
- ε_{ij} – błąd losowy dla j-tej obserwacji w i-tej grupie.

6. Wyniki i dyskusja

6.1. Wpływ mączki z larw *Hermetia illucens* oraz astaksantyny na wskaźniki produkcyjne i zdrowotne prosiąt

W ramach realizacji doświadczenia analizowano wyniki dotyczące wzrostu prosiąt i wykorzystania paszy, z uwzględnieniem oceny statusu zdrowotnego zwierząt na podstawie parametrów hematologicznych i biochemicznych krwi (**P1**). Wyniki te były kluczowe dla uzyskania informacji, w jaki sposób stosowane dodatki paszowe (mączka HI i AST) wpływają na wzrost i zdrowie odsadzonych prosiąt, a także wytyczyły kierunek dalszych badań. Głównym wyzwaniem powodującym straty ekonomiczne w hodowli świń jest okres odsadzenia prosiąt. Ta stresująca faza obejmuje oddzielenie od lochy, zmiany środowiskowe i dietetyczne, zwiększoną ekspozycję na patogeny i nową hierarchię grupową. Odsadzanie zaburza integralność jelit, zmniejsza wydolność trawienną oraz zwiększa podatność na stres oksydacyjny i choroby przez niewykształcony w pełni układ immunologiczny (Campbell i in., 2013; Ding i in., 2022; Y. Li i in., 2018b). Po żywienie, w szczególności łatwostrawne białko o korzystnym składzie aminokwasowym, ma kluczowe znaczenie dla zdrowia prosiąt. Ze względu na zmiany klimatyczne i obawy społeczeństwa dotyczące genetycznie modyfikowanej paszy, potrzebne są nowe źródła białka (Lestigi, 2024). Uwagę zwrócono na mączkę z larwy muchy czarnej (*Hermetia illucens*), bogatą nie tylko w niezbędne aminokwasy, ale także związki bioaktywne, takie jak chityna i kwas laurynowy, które oferują korzyści immunostymulujące, przeciwdrobnoustrojowe i przeciwzapalne, wspierając zdrowie prosiąt (Józefiak i in., 2016; 2017 Mikołajczak i in., 2023). Prosięta szybko rosną przez co tempo ich metabolizmu jest bardzo wysokie, co w połączeniu ze stresem odsadzenia prowadzi do zwiększonej produkcji wolnych rodników i stresu oksydacyjnego. Może to uszkodzić struktury komórkowe, takie jak lipidy, białka i DNA (Luo i in., 2016; Nussey i in., 2009). Dobrą praktyką jest stosowanie przeciwtleniaczy w dawce pokarmowej. Jako przeciwtleniacz w doświadczeniu zastosowano astaksantynę, która jest jednym z pigmentów karotenoidowych o silnych właściwościach antyoksydacyjnych, przeciwzapalnych i przeciwnowotworowych (Park i in., 2010; Lei i Kim., 2014). Astaksantyna pomaga regulować białka mitochondrialne, zmniejszając apoptozę i stan zapalny, jednocześnie wzmacniając funkcję neutrofil i zdolność bakteriobójczą (Kim and Kim, 2019; MacEdo i in., 2010; Wu i in., 2020).

Włączenie mączki z larw HI do dawki pokarmowej nie miało negatywnego wpływu na wyniki wzrostu, masę narządów i odcinków przewodu pokarmowego (obliczoną jako % masy

ciała) prosiąt biorących udział w tym badaniu (**P1**). Nie zaobserwowano negatywnego wpływu mączki HI na spożycie paszy, co wskazuje, że mączka HI nie miała negatywnego wpływu na smakowitość paszy. Także zużycie paszy i średni dzienny przyrost masy ciała były zbliżone w całym doświadczeniu. Badania innych autorów potwierdzają te ustalenia, nie wykazując istotnych różnic we wskaźnikach produkcyjnych przy różnych poziomach mączki HI, z wyjątkiem kilku przypadków zwiększych dziennych przyrostów i masy tuszy (Biasato i in., 2019; Chia i in., 2021; Håkenåsen i in., 2021; Ipema i in., 2021; Spranghers i in., 2018). Takie zróżnicowanie niektórych wyników może być spowodowane zarówno okresem, w którym świnie były objęte eksperymentem (wiek zwierzęcia, długość okresu karmienia) lub wielkością dawki mączki oraz jej formą. To stwierdzenie jest zgodne z obserwacją liniowej poprawy zarówno przyrostów masy ciała, jak i zużycia paszy, gdy dodatek mączki HI w paszy wzrósł z 0 do 4% w ciągu dwóch pierwszych tygodni po odsadzeniu, podczas gdy w czterotygodniowym okresie karmienia nie stwierdzono różnic (Yu i in., 2020).

W przeprowadzonym doświadczeniu nie zaobserwowano istotnego wpływu suplementacji AST na wskaźniki produkcyjne odsadzonych prosiąt (**P1**), co było zgodne z wynikami innych badań przeprowadzonych na świnach otrzymujących w paszy 1,5 - 3 mg AST na kg (Yang i in., 2006) lub 5 - 20 mg/kg (Bergstrom i in., 2009). Ważnym aspektem jest nie tylko wielkość dawki, ale także pochodzenie astaksantyny, gdyż w prezentowanych badaniach zastosowano karotenoid pochodzący z alg *Haematococcus pluvialis*, natomiast część naukowców wybrała AST pozyskaną z drożdży *Phaffia rhodozyma*. Na przykład w przypadku brojlerów otrzymujących 2,3 - 4,6 mg/paszy astaksantyny pozyskanej z drożdży *Phaffia rhodozyma* zauważono poprawę przyrostu masy ciała, ale gorsze wykorzystanie paszy (Jeong and Kim, 2014), podczas gdy znacznie wyższa dawka AST (133 lub 266 mg/kg paszy) z alg *Haematococcus pluvialis* wyraźnie poprawiła zarówno przyrosty masy ciała, jak i zużycie paszy kurcząt brojlerów (Inborr i in., 1997).

W przeprowadzonych badaniach oceniano poziom wskaźników biochemicznych i hematologicznych krwi (**P1**), w Tabelach 1 i 2 przedstawiono wybrane najistotniejsze wyniki tych analiz. Suplementacja mączką HI na poziomie 5% spowodowała wzrost liczby LYM ($P = 0,04$). Analiza interakcji wykazała, że liczba MON i GRA zmieniała się tylko wtedy, gdy oba czynniki dietetyczne były stosowane łącznie (5% mączki HI i AST), odpowiednio $P = 0,01$ i $P = 0,02$. Zarówno mączka HI, jak i AST wpływały na parametry czerwonych krvinek, jednak istotne interakcje odnotowano jedynie dla HCT i MCV, a najwyższe wartości tych parametrów stwierdzono w grupach suplementowanych 5% mączką HI (odpowiednio $P < 0,01$ i $P = 0,02$). W analizie głównych czynników doświadczalnych zauważono istotny wzrost RDWC

u zwierząt otrzymujących AST i 5% mączki HI ($P < 0,01$). Liczba RBC wzrosła u prosiąt otrzymujących AST ($P < 0,01$), natomiast nie zmieniała się w wyniku suplementacji mączką HI. Poziom Fe w surowicy był niższy u prosiąt karmionych mączką HI ($P = 0,01$), lecz wzrósł o około 30% po dodaniu AST ($P < 0,01$). Stężenie HGB obniżyło się zarówno po suplementacji AST ($P < 0,01$), jak i 5% mączką HI ($P = 0,02$). Zarówno AST, jak i mączka HI w dawce 5% zmniejszyły MCH ($P < 0,01$). W przypadku parametrów płytek krwi, jedyny istotny efekt zaobserwowano w PDW, która zmniejszyła się po zastosowaniu 2,5% mączki HI w mieszance paszowej ($P < 0,01$). Analiza statystyczna wykazała istotny wpływ mączki HI na poziom HDL w surowicy odsadzonych prosiąt, który był wyższy w grupie otrzymującej 2,5% mączki HI w porównaniu z grupą otrzymującą 5% mączki HI ($P = 0,031$). Stężenie LDH było wyższe w grupie otrzymującej 5% mączki HI, w porównaniu do grupy kontrolnej oraz otrzymującej 2,5% mączki HI ($P < 0,01$). W analizie profilu wątrobowo-trzustkowego odnotowano interakcję pomiędzy suplementacją mączką HI a dodatkiem AST. Efekt astaksantyny na aktywność ALP był uzależniony od obecności mączki HI w diecie - wprowadzenie astaksantyny do mieszanek paszowych zawierających HI, niezależnie od jej poziomu, spowodowało wzrost ALP w porównaniu z dietą bez mączki HI. Natomiast w grupach prosiąt otrzymujących pasze bez AST nie stwierdzono istotnych różnic w tym parametrze, niezależnie od udziału mączki HI. W grupach otrzymujących 5% mączki HI odnotowano najniższe stężenie GLU w surowicy, podczas gdy u prosiąt otrzymujących AST było ono wyższe ($P < 0,01$) niż niesuplementowanych AST. Stwierdzono interakcję między HI oraz AST w stężeniu ALB. Było ono najniższe w grupach niesuplementowanych AST, ale otrzymujących mączkę HI w ilości 2,5 lub 5%, w porównaniu do pozostałych grup ($P < 0,01$), natomiast w grupach otrzymujących AST nie odnotowano istotnych różnic w tym parametrze, niezależnie od poziomu mączki HI. W analizie profilu nerkowego wykazano wzrost stężenia CREA w grupach otrzymujących AST, natomiast w grupach suplementowanych mączką HI na poziomie 2,5% zaobserwowano niższe stężenie CREA w porównaniu z grupą kontrolną ($P < 0,01$). Zaobserwowano interakcję między mączką HI a AST, w odniesieniu do poziomu TP. Najniższe wartości TP wystąpiły w grupie otrzymującej 5% HI bez AST, podczas gdy suplementacja AST niwelowała ten efekt, niezależnie od poziomu HI ($P < 0,01$). Stężenie Ca było niższe w grupach otrzymujących 5% mączki HI, natomiast wyższe w grupach suplementowanych AST ($P < 0,01$). Suplementacja mączką HI na poziomie 2,5% wpłynęła na wzrost stężenia P, podczas gdy dodatek AST zwiększył stężenie Mg (dla obu $P < 0,01$).

Chociaż zaobserwowano statystycznie istotne różnice między grupami, wskaźniki hematologiczne i biochemiczne krwi mieściły się w normach fizjologicznych (Winnicka,

2008), co wskazuje, że stosowanie mączki HI i astaksantyny nie miało negatywnego wpływu na stan zdrowia odsadzonych prosiąt. Oba dodatki paszowe należy badać zarówno razem, jak i osobno, ponieważ ich efekty mogą się wzajemnie uzupełniać lub wykluczać. Pomimo wyższych poziomów limfocytów w niektórych grupach świnie nie wykazywały żadnych objawów choroby, a parametry odchowu pozostały w normach. Podobne wyniki otrzymał Biasato i in. (2019), podczas suplementowania dawki pokarmowej świń mączką HI, obserwując wzrost komórek odpornościowych proporcjonalny do wzrastającego poziomu dodatku mączki HI. Prezentowane doświadczenie wykazało istotną zależność między stosowaniem mączki z larw *Hermetia illucens* na poziomie 5%, a niektórymi parametrami czerwonokrwinkowymi. Zaskakującym bowiem wynikiem było obniżenie poziomu hemoglobiny i żelaza w surowicy, co z punktu fizjologii jest niekorzystne dla organizmu. Im niższe stężenie hemoglobiny, tym gorsza cyrkulacja tlenu w organizmie, a tym samym gorsza sprawność zwierzęcia. Niektóre badania potwierdzają, że kwas laurynowy w ludzkich czerwonych krwinkach stymuluje erytozę, a ponadto mechanizmem wpływającym na erytozę jest stres oksydacyjny, a stres ten, może być wywoływany przez duże stężenie kwasu laurynowego (Alfhili and Aljuraiban, 2021; Lang i in., 2014). Stąd można założyć, że w niniejszym doświadczeniu ekspozycja na kwas laurynowy, w formie suplementacji mączką HI skutkowała obniżeniem poziomu tych parametrów czerwonych krwinek. Mimo iż, jak wspomniano wcześniej, poziom żelaza w omawianym doświadczeniu nie spadł poniżej zakresu typowego dla gatunku (90-142 µg/dl; Winnicka, 2008), kwestia obniżenia poziomu tego pierwiastka wymaga obserwacji w przyszłych badaniach nad stosowaniem mączki HI w żywieniu prosiąt. Jednak analizując dalsze wyniki, zauważalny jest korzystny wpływ dodatku AST na te parametry (RBC, Fe, HCT, RDWC). Tak więc można sądzić, że AST jako silny antyoksydant częściowo zapobiegł nadmiernemu stresowi oksydacyjnemu przyczyniającemu się do erytozy.

Wpływ udziału mączki z *Hermetia illucens* i astaksantyny w paszy na podstawowy skład chemiczny mięsa (*m. longissimus*) oraz stabilność oksydacyjną mięsa i tkanki tłuszczowej przedstawiono w Tabeli 3 (**P1**). Zaobserwowano istotną interakcję między mączką HI a AST w odniesieniu do zawartości suchej masy ($P = 0,016$). W przypadku grup niesuplementowanych AST, dodatek mączki HI zwiększył jej poziom względem kontroli ($P < 0,05$), natomiast nie odnotowano różnic w obrębie grup suplementowanych AST. Najniższy procent popiołu wmięsie (w przeliczeniu na suchą masę) zaobserwowano w grupie żywionej paszą z udziałem 2,5% mączki HI ($P < 0,01$) oraz w grupach, które nie otrzymywały AST ($P = 0,03$). Zawartość białka i tłuszczy wmięsie (obliczona w suchej masie) nie została zmieniona przez badane dodatki paszowe. Zarówno mączka HI jak i AST znacząco obniżyły poziom TBARS w słoninie

po 3 miesiącach mrożonego przechowywania ($P < 0,01$), a interakcja między tymi czynnikami była statystycznie istotna ($P < 0,01$). W porównaniu z grupą kontrolną, zarówno obecność w paszy mączki HI, jak i AST, obniżyła poziom TBARS (0,3 lub 0,4 mg/kg w grupach II-VI vs. 1,3 mg/kg w grupie I). Natomiast w przypadku mięsa, suplementacja mączką HI nie wpłynęła na poziom TBARS, podczas gdy suplementacja AST spowodowała niewielki wzrost tego parametru ($P < 0,01$).

Ważnym aspektem produkcji wieprzowiny są wyniki dotyczące trwałości i jakości produktu zwierzęcego. W ramach badań wchodzących w skład Rozprawy Doktorskiej analizowano odporność mięsa (*longissimus m.*) i słoniny na utlenianie w czasie 3 miesięcznego przechowywania w temperaturze -20°C, przy użyciu testu TBARS. Metoda oznaczania poziomu malondialdehydu, jest cennym wskaźnikiem peroksydacji lipidów i podatności na utlenianie. Odzwierciedla stopień utleniania: im wyższa wartość TBARS, tym intensywniejsze jest utlenianie lipidów. W przeprowadzonym badaniu stwierdzono, że po 3-miesięcznym mrożeniu mączka HI i AST dodane do mieszanki paszowej skutecznie obniżyły poziom TBARS w tkance słoniny, jednakże nie były skuteczne w odniesieniu do ochrony stabilności oksydacyjnej w mieście przechowywanym w tych samych warunkach. W badaniach Yang i in. (2006), w których tuczniki otrzymywały paszę z dodatkiem 1,5 lub 3 mg AST także nie stwierdzono różnic w poziomie TBARS po 10 dniach przechowywania mięsa w temperaturze 4°C, natomiast w badaniach Carr i in. (2010) odnotowano skuteczność AST w hamowaniu procesów utleniania lipidów w mieście świń otrzymujących w paszy 66,7 mg/kg AST. Po przeanalizowaniu wyników własnego doświadczenia można stwierdzić, że zarówno mączka HI, jak i AST są obiecującym dodatkiem paszowym wspierającym stabilność oksydacyjną, przy czym w większym stopniu w odniesieniu do tkanki tłuszczowej niż mięśniowej. Możliwe, że wyższa zawartość tłuszczy w tkance sprzyja lepszemu wykorzystaniu mechanizmów antyoksydacyjnych tych dodatków, ale zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Tabela 1. Wpływ udziału mączki z *Hermetia illucens* i astaksantyny w paszy na wybrane wskaźniki hematologiczne krwi prosiąt

Parametr	Czynnik HI: mączka z larw <i>H. illucens</i>			Czynnik AST: astaksantyna		I	II	III	IV	V	VI	<i>P-value</i>			SEM
	0	2,5	5	-	+	0HI	2,5HI	5HI	2,5HI +AST	5HI +AST	0HI +AST	HI	AST	HI×AST	
LYM, $10^3/\mu\text{L}$	4,5 ^a	6,3 ^{ab}	7,0 ^b	5,3	7,2	4,4	5,1	6,3	7,6	8,4	4,6	0,043	0,058	0,508	0,43
MON, $10^3/\mu\text{L}$	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4 ^{ab}	0,5 ^{ab}	0,4 ^a	0,3 ^a	0,6 ^b	0,5 ^{ab}	0,444	0,308	0,012	0,02
GRA, $10^3/\mu\text{L}$	4,6	4,7	4,5	4,6	4,6	5,1 ^{ab}	5,0 ^{ab}	3,9 ^{ab}	4,4 ^{ab}	5,8 ^b	3,4 ^a	0,657	0,733	0,022	0,24
RBC, $10^6/\mu\text{L}$	6,2	6,5	6,1	5,7 ^a	6,9 ^b	5,7	6,1	5,4	6,9	6,9	6,8	0,210	<0,01	0,218	0,12
HGB, g/dL	12,9 ^a	12,7 ^a	11,7 ^b	13,0 ^a	11,8 ^b	13,9	13,4	11,8	12,0	11,7	11,8	0,024	<0,01	0,081	0,20
Fe, $\mu\text{g/dL}$	140,3 ^a	116,4 ^b	107,0 ^b	106,1 ^a	137,8 ^b	125,8	104,1	86,0	128,8	128,0	156,6	0,011	<0,01	0,743	5,37
HCT %	39,8	41,0	35,6	35,5	42,3	37,7 ^b	38,3 ^{bc}	30,3 ^a	43,7 ^d	41,0 ^{cd}	42,2 ^d	<0,01	<0,01	<0,01	0,74
RDWC %	18,8 ^a	18,0 ^a	20,0 ^b	18,5 ^a	19,4 ^b	18,5	17,2	19,8	18,7	20,2	19,2	<0,01	0,032	0,518	0,23
MCV, μm^3	64,0	63,4	58,4	62,2	61,7	65,7 ^d	63,2 ^{cd}	57,1 ^a	63,5 ^{cd}	59,6 ^{ab}	62,1 ^{bc}	<0,01	0,724	0,025	0,59
MCH, pg	21,3 ^a	19,8 ^b	19,6 ^b	22,9 ^a	17,5 ^b	24,2	22,1	22,3	17,5	17,0	18,0	<0,01	<0,01	0,120	0,43
PDW, %	39,9 ^a	31,9 ^b	43,6 ^a	36,9	40,2	37,3	31,2	42,0	32,5	45,2	42,9	<0,01	0,079	0,652	1,16

I, II, III, IV, V, VI - grupa I - kontrola; grupa II - dodatek 2,5% mączki z larw HI; grupa III - dodatek 5% mączki z larw HI; grupa IV - dodatek 2,5% mączki z larw HI i AST; grupa V - dodatek 5% mączki z larw HI i AST; grupa VI - dodatek AST.

a, b, c, d – średnie w wierszach oznaczone różnymi literami, różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

Skróty: LYM – limfocyty, MON – monocity, GRA – granulocyty, RBC – erytrocyty, HGB – hemoglobina, Fe – żelazo, HCT – hematokryt, MCV – średnia objętość krwinki czerwonej, MCH – średnia hemoglobina krwinki czerwonej, RDWC – szerokość rozkładu czerwonych krwinek, PDW – stopień zróżnicowania wielkości płytek krwi

Tabela 2. Wpływ udziału mączki z *Hermetia illucens* i astaksantyny w paszy na wybrane wskaźniki biochemiczne krwi prosiąt

Parametr	Czynnik HI: mączka z larw <i>H. illucens</i>			Czynnik AST: astaksantyna		I	II	III	IV	V	VI	<i>P-value</i>			SEM
	0	2,5	5	-	+	0HI	2,5HI	5HI	2,5HI +AST	5HI +AST	0HI +AST	HI	AST	HI×AST	
Profil lipidowy															
HDL, mg/dL	40,5 ^{ab}	44,7 ^a	38,7 ^b	40,3	42,2	38,8	44,7	37,6	44,6	39,8	42,3	0,031	0,321	0,716	0,94
LDH, U/L	1324,7 ^a	1482,1 ^a	1706,8 ^b	1528	1472,5	1300,7	1556,6	1755,1	1407,5	1658,4	1351,7	<0,01	0,426	0,576	45,10
Profil wątrobowo- trzustkowy															
ALP, U/L	237,5	255,4	261,4	234,8	268,2	263,4 ^{ab}	217,5 ^a	220,0 ^a	293,4 ^b	302,8 ^b	208,4 ^a	0,374	0,031	<0,01	9,08
GLU, mg/dL	135,6 ^a	136,4 ^a	120,9 ^b	121,2 ^a	141,3 ^b	131,8	124,1	106,3	148,6	135,5	139,9	0,046	<0,01	0,269	3,25
ALB, g/dL	4,2	3,9	3,9	3,9	4,1	4,34 ^d	3,8 ^{ab}	3,7 ^a	4,1 ^{bcd}	4,2 ^{cde}	4,0 ^{abc}	0,058	0,115	<0,01	0,01
Profil nerkowy															
CREA, mg/dL	1,0 ^a	0,9 ^b	1,0 ^{ab}	0,9 ^a	1,0 ^b	1,0	0,8	0,9	1,0	1,1	1,0	0,022	<0,01	0,177	0,02
TP, g/dL	6,3	6,2	6,0	6,1	6,3	6,4 ^b	6,1 ^b	5,6 ^a	6,3 ^b	6,4 ^b	6,2 ^b	0,174	0,051	<0,01	0,07
Ca, mg/dL	12,2 ^a	12,7 ^a	10,9 ^b	11,5 ^a	12,4 ^b	11,8	12,6	10,0	12,9	11,8	12,6	<0,01	<0,01	0,085	0,19
P, mg/dL	10,3 ^a	11,4 ^b	9,6 ^a	10,6	10,3	10,5	11,3	10,0	11,4	9,2	10,1	<0,01	0,322	0,581	0,19
Mg, mg/dL	2,2	2,3	2,2	2,1 ^a	2,4 ^b	2,1	2,3	2,0	2,4	2,3	2,3	0,162	<0,01	0,603	0,05
Profil kostny															
Ca, mg/dL	12,2 ^a	12,7 ^a	10,9 ^b	11,5 ^a	12,4 ^b	11,8	12,6	10,0	12,9	11,8	12,6	<0,01	<0,01	0,085	0,19
P, mg/dL	10,3 ^a	11,4 ^b	9,6 ^a	10,6	10,3	10,5	11,3	10,0	11,4	9,2	10,1	<0,01	0,322	0,581	0,19
ALP, U/L	237,5	255,4	261,4	234,8	268,2	263,4 ^{ab}	217,5 ^a	220,0 ^a	293,4 ^b	302,8 ^b	208,4 ^a	0,374	0,031	<0,01	9,08
ALB, g/dL	4,2	3,9	3,9	3,9	4,1	4,3 ^d	3,8 ^{ab}	3,6 ^a	4,1 ^{bcd}	4,2 ^{cde}	3,9 ^{abc}	0,058	0,115	<0,01	0,05

I, II, III, IV, V, VI - grupa I - kontrola; grupa II - dodatek 2,5% mączki z larw HI; grupa III - dodatek 5% mączki z larw HI; grupa IV - dodatek 2,5% mączki z larw HI i AST; grupa V - dodatek 5% mączki z larw HI i AST; grupa VI - dodatek AST.

a, b, c, d - średnie w wierszach oznaczone różnymi literami, różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

Skróty: ALB – albumina, ALP – fosfataza alkaliczna, GLU – glukoza, CREA – kreatynina, TP - białko całkowite, Ca – wapń, P – fosfor, Mg – magnez, HDL – lipoproteiny o dużej gęstości, LDH – dehydrogenaza mleczanowa

Tabela 3. Wpływ udziału mączki z *Hermetia illucens* i astaksantyny w paszy na podstawowe analizy chemiczne mięsa (*m. longissimus*) oraz stabilność oksydacyjną mięsa i tkanki tłuszczowej

Parametr	Czynnik HI: mączka z larw <i>H. illucens</i>			Czynnik AST: astaksantyna		I	II	III	IV	V	VI	<i>P-value</i>			SEM
	0	2,5	5	-	+	0HI	2,5HI	5HI	2,5HI +AST	5HI +AST	0HI +AST	HI	AST	HI×AST	
Zawartość składników odżywczych w mięsie															
Sucha masa, %	23,50	24,10	23,60	23,81	23,72	23,21 ^a	24,20 ^c	23,95 ^{bc}	23,92 ^{bc}	23,43 ^{ab}	23,83 ^{bc}	0,007	0,706	0,016	0,09
Białko, % sm	87,81	80,4	86,2	82,9	86,9	88,3	74,4	85,2	86,34	87,23	87,10	0,074	0,123	0,132	1,44
Tłuszcze, % sm	7,72	7,52	7,30	7,91	7,13	8,43	7,62	7,54	7,43	7,23	6,82	0,871	0,112	0,348	0,21
Popiół, % sm	5,21 ^a	4,33 ^b	5,01 ^a	4,72 ^a	5,03 ^b	5,13	4,12	4,91	4,62	5,13	5,33	<0,010	0,030	0,633	0,01
Zawartość TBARS w tkankach (mg/kg)															
Tkanka mięśniowa (<i>longissimus m.</i>)	0,30	0,31	0,31	0,25 ^a	0,31 ^b	0,30	0,30	0,21	0,32	0,33	0,34	0,160	0,002	0,144	0,01
Tkanka tłuszczowa (słonina grzbietowa)	0,80	0,33	0,42	0,72	0,31	1,30 ^a	0,31 ^b	0,44 ^b	0,31 ^b	0,41 ^b	0,30 ^b	<0,010	<0,010	<0,010	0,07

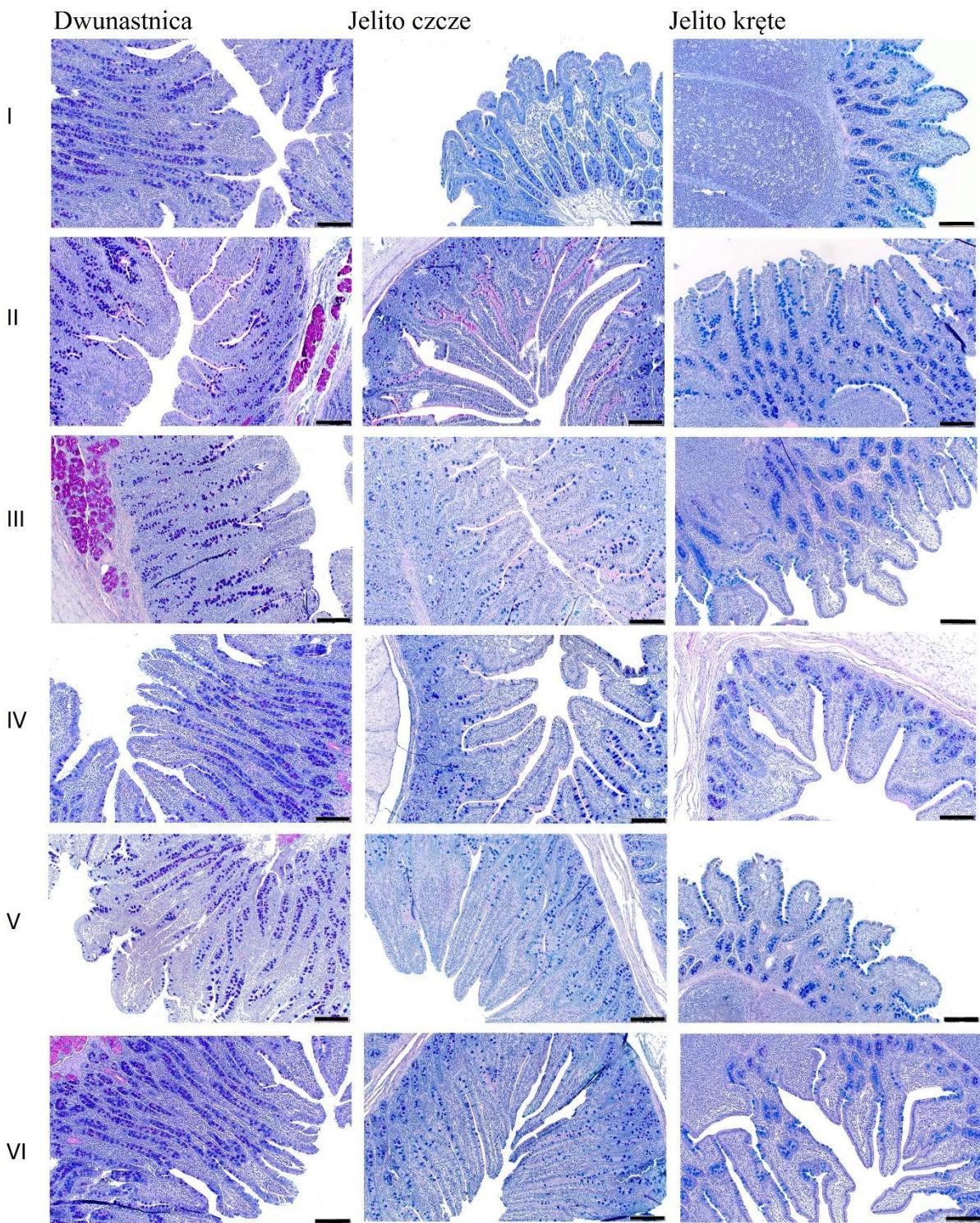
I, II, III, IV, V, VI - grupa I - kontrola; grupa II - dodatek 2,5% mączki z larw HI; grupa III - dodatek 5% mączki z larw HI; grupa IV - dodatek 2,5% mączki z larw HI i AST; grupa V - dodatek 5% mączki z larw HI i AST; grupa VI - dodatek AST.

a, b, c – średnie w wierszach oznaczone różnymi literami, różnią się istotnie przy $p \leq 0,05$.

6.2. Wpływ mączki z larw *Hermetia illucens* oraz astaksantyny na strukturę jelita cienkiego prosiąt

W dalszej części badań skoncentrowano się na zdrowiu i funkcjonalności jelit (**P2**), które w okresie odsadzeniowym są szczególnie podatne na różnego rodzaju dysfunkcje będące wynikiem stresu oraz zmieniających się warunków środowiskowych i żywienia (Rycina 2.).

Okres odsadzenia stanowi kluczowy i stresogenny moment w życiu prosiąt, często powodując poważne zaburzenia w funkcjonowaniu układu pokarmowego i immunologicznego (Campbell i in., 2019). Odsadzenie, a także nagła zmiana środowiska oraz rodzaju pokarmu, mogą prowadzić do naruszenia integralności bariery jelitowej, zmniejszenie wysokości kosmków oraz pogłębienia krypt jelitowych. Takie zmiany strukturalne upośledzają wchłanianie składników odżywczych i negatywnie wpływają na funkcjonowanie przewodu pokarmowego (Xiong i in., 2019). W kontekście ograniczeń stosowania antybiotyków w hodowli zwierząt poszukuje się alternatywnych metod, takich jak zoptymalizowane strategie żywieniowe oraz dodatki naturalne, które mogłyby wspierać zdrowie prosiąt (Kil and Stein, 2010). Mączka z larw *Hermetia illucens* (HI), bogata w kwas laurynowy, peptydy przeciwdrobnoustrojowe oraz chitynę, wykazuje obiecujące wyniki w zakresie wspierania zdrowia jelit i ograniczania rozwoju patogenów (Józefiak i in., 2016). W związku z tym, że odsadzenie znacząco zwiększa poziom stresu oksydacyjnego, co prowadzi do uszkodzenia komórek oraz stymuluje powstawanie stanów zapalnych, stosowanie przeciwtleniaczy, takich jak astaksantyna, może stanowić skuteczne wsparcie zdrowotne młodych zwierząt. Astaksantyna (AST), będąca silnym przeciwtleniaczem, wzmacnia odpowiedź immunologiczną oraz chroni komórki jelitowe przed apoptozą i stremem oksydacyjnym (Igielska-Kalwat i in., 2015.).



Rycina 2. Zdjęcia reprezentatywne preparatów histologicznych z jelit prosiąt. I-VI numery grup doświadczalnych. Powiększenie 4×, pasek skali = 200 µm. Barwienie: Pas-Alcian.

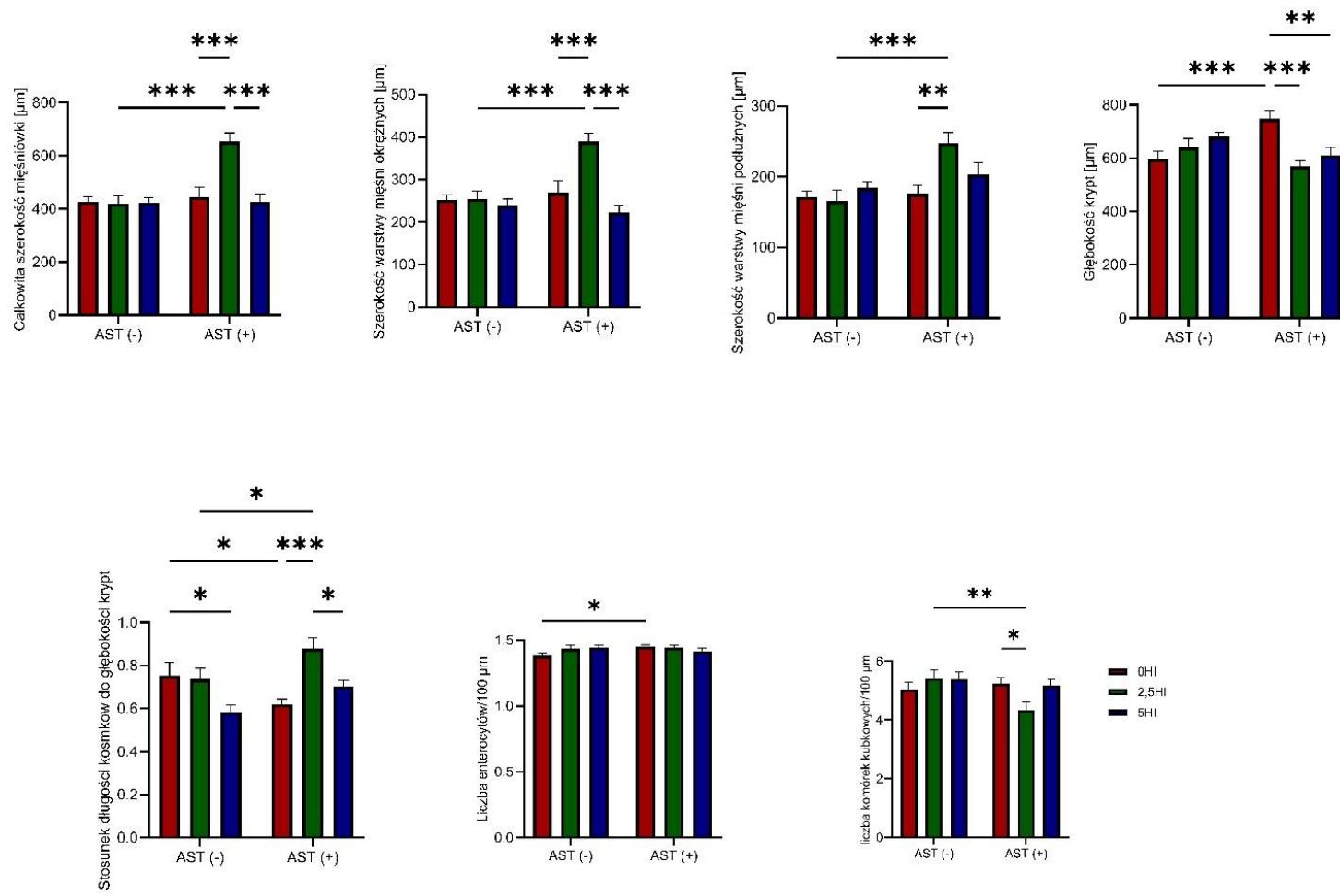
Oba badane dodatki dodawane do paszy wywierały zróżnicowany wpływ na analizowane struktury dwunastnicy. Oddzielny efekt oddziaływania mączki HI zaobserwowano w długości i szerokości kosmków, natomiast AST jako samodzielny czynnik wpływał na szerokość krypt. Z kolei, interakcję pomiędzy odziaływaniem mączki HI a AST zauważono w przypadku szerokości całej mięśniówki, warstwy mięśni okrężnych i podłużnych, głębokości krypt, stosunku długości kosmków do głębokości krypt (VC), liczbę komórek kubkowych i enterocytów na 100 μm kosmka (Wykres 1). Analizując uzyskane dane można zauważyć, że 2,5% dodatek mączki HI zwiększał długość i szerokość kosmków ($P < 0,05$), natomiast w grupach otrzymujących dodatek AST odnotowano najszerze krypty ($P < 0,05$). Suplementacja łącznie 2,5% mączki HI z AST spowodowała znaczny wzrost całkowitej szerokości mięśniówki i warstwy mięśni okrężnych w przeciwieństwie do grup otrzymujących AST, lub 2,5% HI ($P < 0,001$). Warstwa mięśni podłużnych była również szersza w grupie 2,5% HI z AST niż w grupie 2,5% HI ($P < 0,001$) czy też w przypadku suplementacji samą AST ($P < 0,01$). Dodanie samej AST do paszy spowodowało wzrost głębokości krypt w porównaniu do grupy bez tego dodatku ($P < 0,001$) oraz grup 2,5% HI z AST i 5% HI z AST (odpowiednio $P < 0,001$ i $P < 0,01$). Wyższy stosunek VC zaobserwowano w grupie 2,5% HI z AST niż w grupie samej AST ($P < 0,001$), 5% HI z AST ($P < 0,05$) i 2,5% HI ($P < 0,05$). Jednak parametr ten był znacznie wyższy w grupie kontrolnej niż w grupie z samym dodatkiem AST ($P < 0,05$).Więcej enterocytów na 100 μm zaobserwowano w grupie z samą AST niż w grupie kontrolnej ($P < 0,05$). I odwrotnie, więcej komórek kubkowych na 100 μm odnotowano w grupach 2,5% HI ($P < 0,01$) i samej AST ($P < 0,05$) niż w grupie 2,5% HI z AST. Mączka na poziomie 2,5% wpłynęła na rozszerzenie i wydłużenie kosmków, a w połączeniu z AST także na rozszerzenie mięśniówki, jednocześnie zmniejszając liczbę komórek kubkowych. Nie stwierdzono istotnych różnic w grubości błony śluzowej lub powierzchni chłonnej w dwunastnicy.

W jelicie czczym również zauważono wpływ obu czynników głównych. Dodatek AST wpływał na szerokość błony śluzowej, warstwy mięśni podłużnych, liczbę komórek kubkowych i długość kosmków. W przypadku dodatku mączki HI zauważono jej odziaływanie na szerokość krypt. Interakcje między czynnikami zaobserwowano w odniesieniu do szerokości całej mięśniówki, szerokości kosmków, liczby enterocytów oraz powierzchni chłonnej jelita (Wykres 2). AST spowodowała znaczne poszerzenie błony śluzowej oraz warstwy mięśni podłużnych jelita czczego w porównaniu z grupą niesuplementowaną ($P < 0,01$). Długość kosmków była determinowana obecnością AST – jej dodatek wydłużał kosmki ($P < 0,05$). Więcej komórek kubkowych zaobserwowano w grupie bez dodatków niż w grupie suplementowanej samą AST ($P < 0,05$). Szersze krypty wystąpiły w grupach

suplementowanych mączką na obu poziomach ($P < 0,05$). Znacznie szerszą mięśniówkę stwierdzono w grupie 5% HI z AST niż w grupie otrzymującej jedynie AST ($P < 0,05$) lub 5% HI ($P < 0,05$). Co ciekawe, grupa bez HI lub bez AST miała grubszą warstwę mięśniową niż grupa z AST ($P < 0,05$). Dodatkowo, kombinacja 2,5% HI i AST znaczco poszerzyła kosmki w porównaniu do grupy z samą AST ($P < 0,01$) i 2,5% HI ($P < 0,01$), a także w grupie 5% HI z AST w porównaniu do grupy z samą AST ($P < 0,05$) i 2,5% HI ($P < 0,05$). Znacznie większa powierzchnia chłonna jelit i wyższy stosunek kosmków do krypt były obecne w grupie z samą AST (odpowiednio $P < 0,001$ i $P < 0,05$) oraz w grupie z 2,5% HI (oba $P < 0,05$) w porównaniu z grupą bez dodatków. Najwyższą liczbę enterocytów stwierdzono w jelcie czczym u świń, które nie otrzymywały żadnych dodatków w paszy, w porównaniu do grup 2,5% HI ($P < 0,001$) i samej AST ($P < 0,001$). Co więcej, zwierzęta otrzymujące 5% HI miały liczbę enterocytów prawie tak wysoką, jak te w grupach 2,5% HI ($P < 0,01$) i 5% HI z AST ($P < 0,001$). Ogólnie rzecz biorąc, połączenie HI i AST wydaje się znaczco poprawiać niektóre parametry strukturalne jelita czczego, w tym zwiększenie grubości mięśniówki i wymiary kosmków, w porównaniu z każdym z suplementów osobno. Nie stwierdzono znaczących różnic w głębokości krypty i grubości warstwy mięśnia okrężnego między grupami.

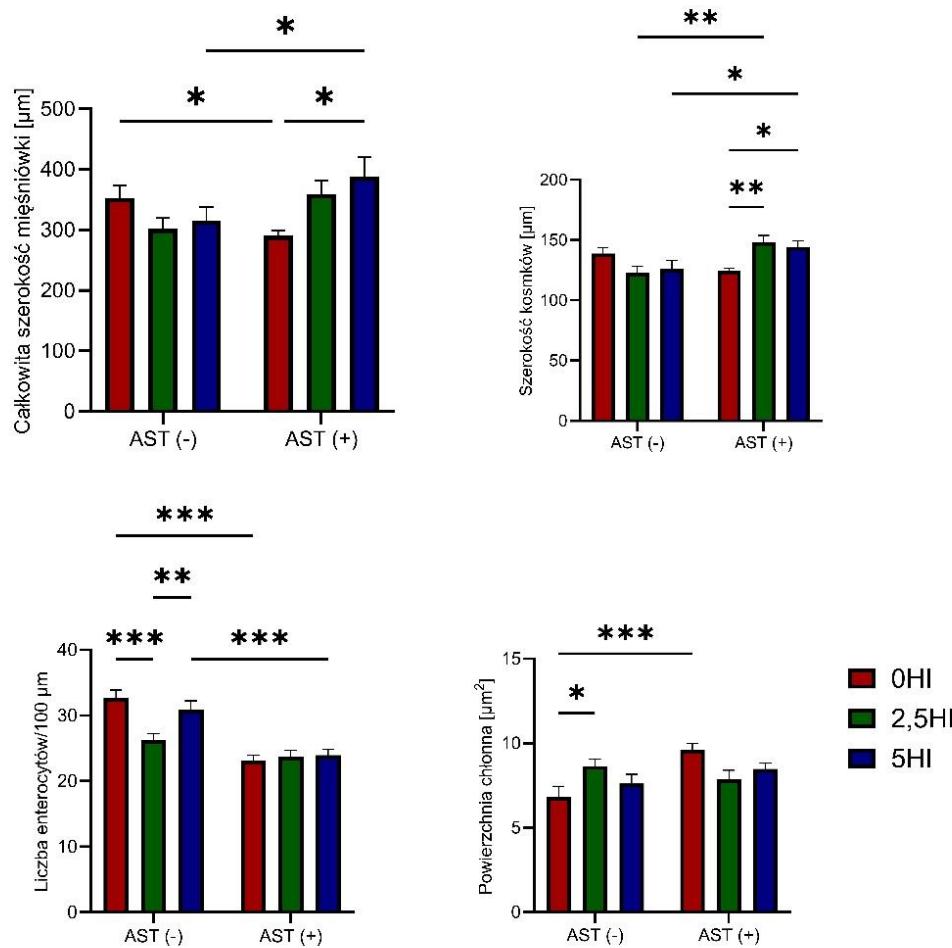
W jelcie krętym zaobserwowano wpływ obu badanych dodatków. AST wpływała na mierzoną szerokość krypt, natomiast mączka HI odziaływała na długość kosmków, głębokość krypt oraz stosunek długości kosmków do głębokości krypt. Ponadto oba czynniki, jako efekty główne, miały wpływ na szerokość mięśni okrężnych. Interakcję między czynnikami odnotowano w szerokości całej mięśniówki i warstwy mięśni podłużnych, a także w szerokości kosmków i liczbie enterocytów (Wykres 3). Suplementacja 2,5% HI zwiększyła grubość tej warstwy w porównaniu zarówno do grupy 2,5% HI ($P < 0,001$), jak i grupy 5% HI z AST ($P < 0,01$). Co więcej, warstwa mięśni okrężnych była znacznie szersza w grupie suplementowanej AST niż w grupach 5% HI z AST ($P < 0,01$) i bez suplementacji ($P < 0,001$). Oznacza to, że mączka na poziomie 2,5% i AST działa korzystnie na warstwę mięśni okrężnych. W grupie 5% HI zaobserwowano wyższy stosunek długości kosmków do głębokości krypt niż w grupie bez suplementacji ($P < 0,05$). Suplementacja HI w dawkach 2,5% i 5% spowodowała znaczny wzrost długości kosmków w porównaniu z grupą bez suplementacji (odpowiednio $P < 0,05$ i $P < 0,001$). Najgłębsze krypty odnotowano w grupie 5% HI ($P < 0,01$). Mniej enterocytów na 100 μm stwierdzono w grupie 5% HI niż zarówno w grupie 2,5% HI ($P < 0,001$), jak i w grupie bez suplementacji ($P < 0,05$). I odwrotnie, większą liczbę enterocytów zaobserwowano w grupie 5% HI + AST niż zarówno w grupie 5% HI bez AST ($P < 0,001$), jak i w grupie 2,5% HI + AST ($P < 0,01$). Dodatkowo, więcej enterocytów zliczono

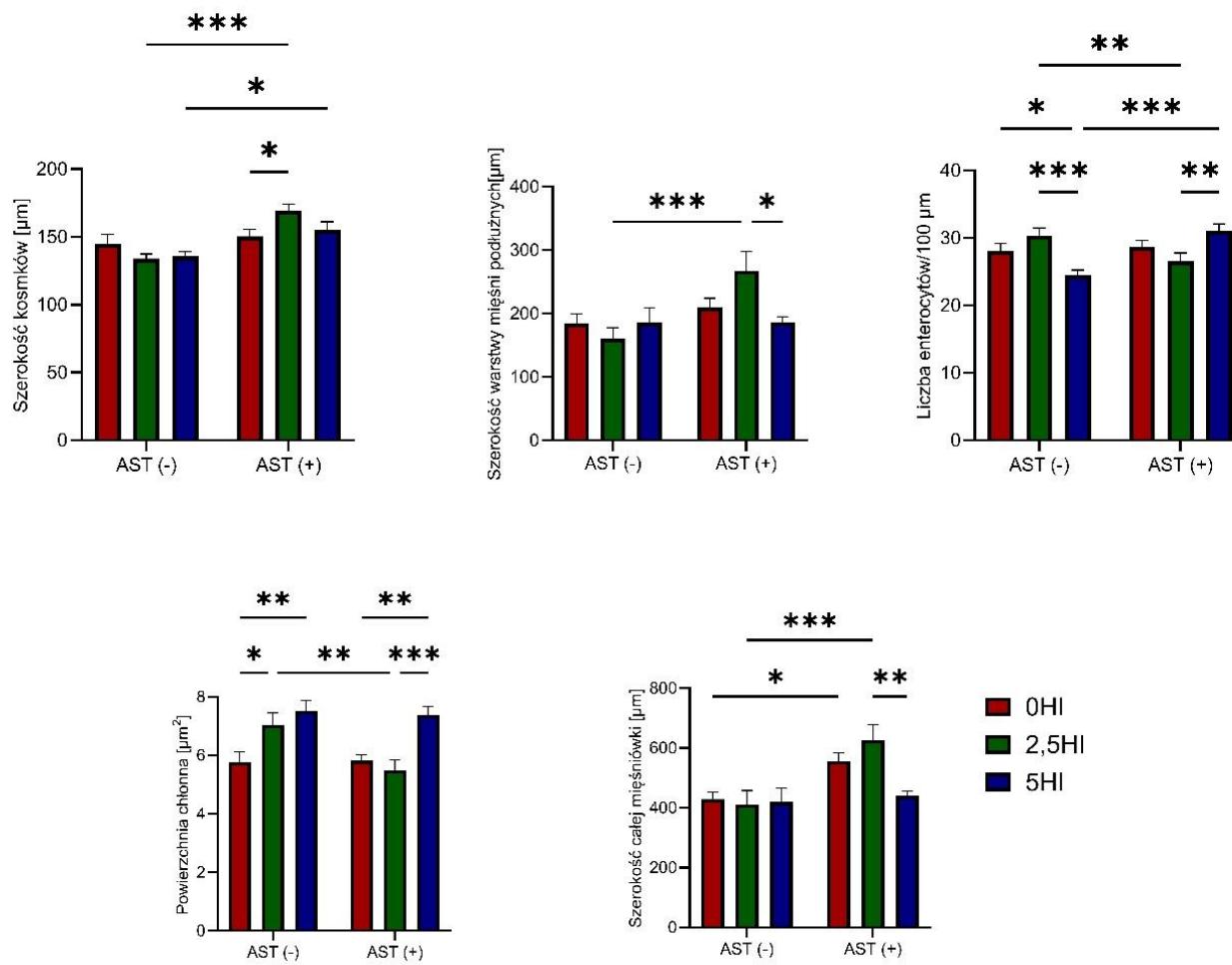
w grupie 2,5% HI niż w grupie 2,5% HI + AST ($P < 0,001$). Suplementacja paszy 2,5% HI + AST spowodowała znaczny wzrost całkowitej mięśniówki w jelicie krętym w porównaniu z grupą 2,5% HI ($p < 0,001$) i grupą 5% HI + AST ($p < 0,01$). Warstwa mięśniowa była również wyraźnie grubsza w grupie suplementowanej AST niż w grupie bez suplementacji ($p < 0,05$). Mniej zmian zaobserwowano w warstwie mięśni podłużnych. Szerszą warstwę zaobserwowano w grupie 2,5% HI z AST niż w grupach 2,5% HI ($P < 0,001$) i 5% HI z AST ($P < 0,05$). Znacznie szersze kosmki stwierdzono w grupie 2,5% HI z AST niż w grupach samej AST ($P < 0,01$) i 2,5% HI ($P < 0,01$). Co więcej, szersze kosmki zaobserwowano w grupie 5% HI z AST niż w grupie 5% HI ($P < 0,05$). Różnice w powierzchni wchłaniania w większości odzwierciedlały te obserwowane w długości kosmków. Suplementacja HI spowodowała znaczący wzrost powierzchni wchłaniania w jelicie krętym zarówno przy 2,5%, jak i 5% w porównaniu do kontroli bez HI (odpowiednio $P < 0,05$ i $P < 0,01$). Powierzchnia wchłaniania w grupie 5% HI z AST była najwyższa wśród grup suplementowanych AST ($P < 0,01$ vs. AST bez HI i $P < 0,001$ vs. 2,5% HI z AST). Jednak suplementacja AST zmniejszyła powierzchnię wchłaniania w grupie z 2,5% HI z AST w porównaniu z 2,5% samą HI ($P < 0,01$). Połączenie 2,5% HI i AST znaczco poprawiło cechy morfologiczne jelita krętego, co sugeruje efekt synergistyczny, gdy AST jest połączona z HI. Nie zaobserwowano znaczących różnic w szerokości błony śluzowej, szerokości krypt oraz liczbie komórek kubkowych na 100 μm .



Wykres 1. Wpływ interakcji pomiędzy mączką z larw *Hermetia illucens* (HI) oraz astaksantyną (AST) na wybrane parametry strukturalne ściany dwunastnicy (P2)

Skróty: AST(-) – brak dodatku astaksantyny, AST(+) – dodatek astaksantyny; 0HI, 2,5HI, 5HI – dodatek mączki z *Hermetia illucens* odpowiednio w ilości 0, 2,5 lub 5%. Słupki przedstawiają średnie dla grupy, a wąsy - SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.





Wykres 3. Wpływ interakcji pomiędzy mączką z larw *Hermetia illucens* (HI) oraz astaksantyną (AST) na wybrane parametry strukturalne ściany jelita krętego (**P2**)

Skróty: AST(-) – brak dodatku astaksantyny, AST(+) – dodatek astaksantyny; 0HI, 2.5HI, 5HI – dodatek mączki z *Hermetia illucens* odpowiednio w ilości 0, 2,5 lub 5%. Słupki przedstawiają średnie dla grupy, a wąsy - SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

W prezentowanym doświadczeniu przeanalizowano dodatki paszowe – mączkę HI i AST – wspomagające zdrowie prosiąt i mające na celu złagodzenie negatywnych skutków odsadzenia. We wcześniejszych badaniach opisywano rolę AST w redukcji stanu zapalnego i uszkodzeń oksydacyjnych w różnych modelach zwierzęcych, co sugerowało podobne efekty u prosiąt (Lee i in., 2022). Wyniki prezentowanych badań potwierdziły zwiększoną proliferację enterocytów i poprawę struktury jelit.

W doświadczeniu opisywanym w tej Rozprawie świnie karmione paszą z dodatkiem 5% mączki HI wykazały zwiększoną wysokość kosmków w jelicie krętym oraz wyższy stosunek długości kosmków do głębokości krypt. Ten efekt jest zgodny z badaniami wykazującymi podobne wyniki przy różnych poziomach suplementacji mączką HI (Jin i in., 2021; Tang i in., 2022). Dodanie mączki HI na poziomie 2,5% zwiększyło również liczbę komórek kubkowych w dwunastnicy, potencjalnie wzmacniając obronę jelitową lub wspomagając adaptację pierwszego odcinka jelita do podanego suplementu. Jednoczesne podawanie AST wraz z mączką HI dodatkowo wzmacniło strukturę jelit, zwiększając grubość mięśni i głębokość krypt, co prawdopodobnie sprzyjało lepszej perystaltyce i mogło potencjalnie zwiększyć zdolność do absorpcji składników odżywcznych. Badania na szczurach potwierdzają korzyści wynikające z podawania AST do paszy, takie jak zwiększyony rozmiar kosmków i zmniejszona apoptoza (Akduman i in., 2022; Yilmaz i in., 2022). Wykazano również, że mieszanki przeciwtleniaczy łagodzą negatywne skutki odsadzenia, wpływające na zaburzenia związane z histologią jelit (Zhu i in., 2012). Wyniki prezentowanych badań sugerują, że poprawa parametrów histologicznych jelita cienkiego w wyniku dodatku mączki HI może być dodatkowo wzmacniona właściwościami antyoksydacyjnymi AST, co prowadzi do lepszego utrzymania struktury i funkcji błony śluzowej oraz mięśniówki jelita. Oba czynniki żywieniowe zwiększą powierzchnię wchłaniania w wybranych odcinkach jelita cienkiego. Efekt ten może wynikać z obniżenia stresu oksydacyjnego, działania przeciwpalnego, dostarczania substancji odżywcznych oraz aktywności prebiotycznej dodatków (MacEdo i in., 2010; Mikołajczak i in., 2023).

6.3. Wpływ mączki z larw *Hermetia illucens* oraz astaksantyny na proliferację i barierę jelitową jelita cienkiego prosiąt

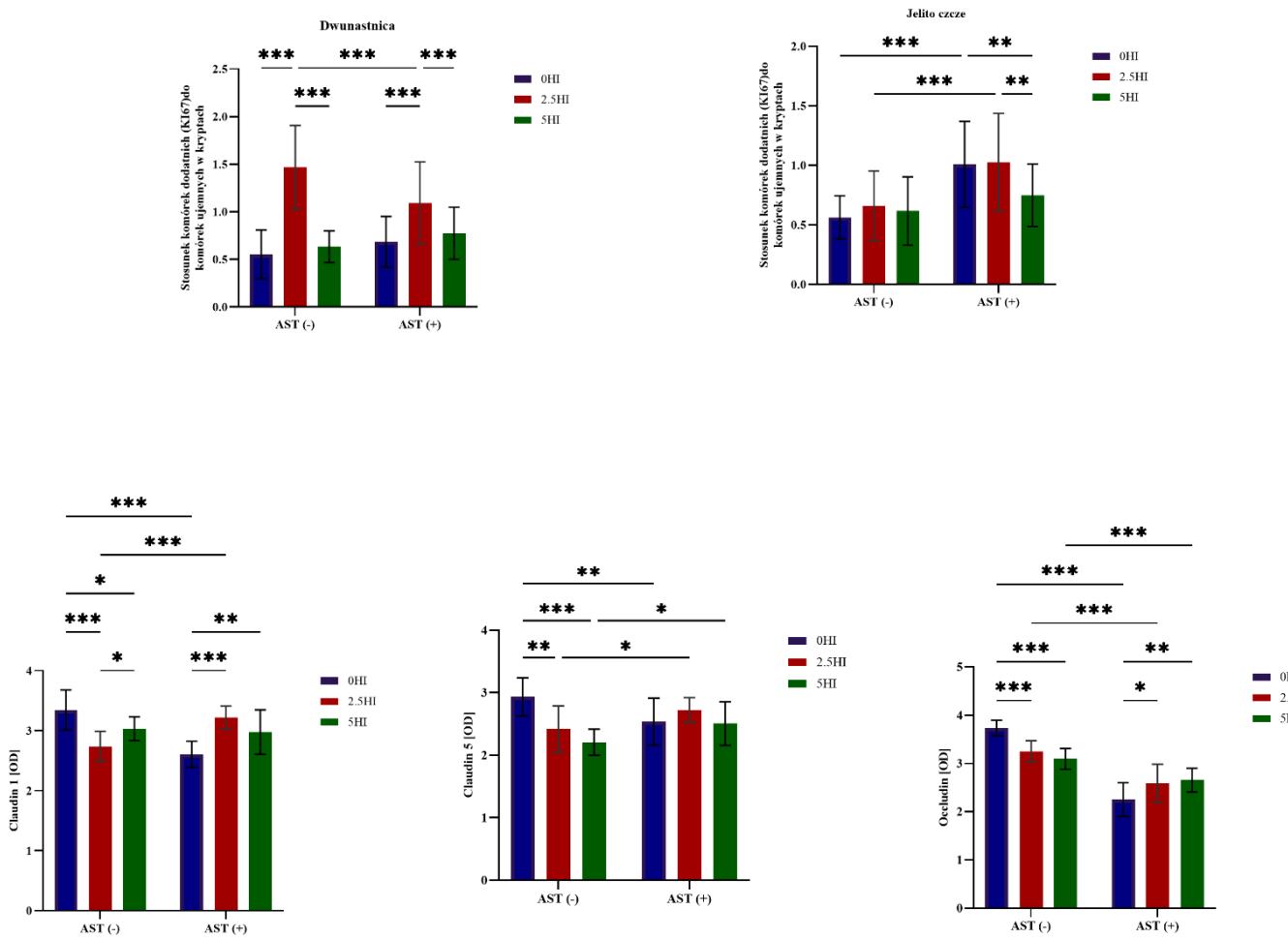
Kolejnym etapem prac badawczych była analiza przepuszczalność bariery jelitowej oraz poziom odnowy błony śluzowej w jelicie cienkim prosiąt (P2). Obliczono stosunek komórek proliferujących do komórek nieproliferujących w kryptach jelita cienkiego (Wykres 4). W dwunastnicy i jelicie czczym zaobserwowano łączny wpływ dodatku mączki HI i AST na proliferację komórek w kryptach. Nie wykazano natomiast znaczących różnic w jelicie

krętym. W dwunastnicy znacząco wyższy stosunek komórek proliferujących, oznaczonych przeciwciałem Ki-67, do komórek nieproliferujących wykazano w grupie 2,5% HI w porównaniu z grupami 5% HI ($P < 0,001$), 2,5% HI z dodatkiem AST ($P < 0,001$) oraz grupą bez suplementacji (wszystkie $P < 0,001$). Co więcej, grupa 2,5% HI z AST wykazywała wyższy stosunek niż grupy z samą AST ($P < 0,001$) i 5% HI z AST (wszystkie $P < 0,001$). W jelicie czczym proporcja komórek proliferujących była istotnie wyższa w grupie 2,5% HI z AST w porównaniu z grupami 5% HI z AST ($P < 0,01$) i 2,5% HI ($P < 0,001$). Dodatkowo, grupa z samą AST wykazywała wyższy stosunek niż grupa bez suplementacji ($P < 0,001$) oraz grupa 5% HI z AST ($P < 0,01$). Wyniki wskazują więc istotną interakcję między 2,5% HI a AST, wpływającą na liczbę komórek proliferujących. Homeostaza nabłonka jelitowego opiera się na równowadze między proliferacją komórek w kryptach a złuszczeniem ich na końcu kosmka (Negroni i in., 2015). W prezentowanym badaniu wykorzystano białko Ki-67, które do oceny stopnia proliferacji komórek w dwunastnicy, jelicie czczym i jelicie krętym. W dwunastnicy i jelicie czczym dodanie 2,5% mączki owadów zwiększyło proliferację komórek, przy czym AST zwiększała proliferację tylko w jelicie czczym. Kwas laurynowy również wpływa na proliferację komórek, co zostało potwierdzone w badaniach Liu i in. (2021) i Zeng i in. (2022). Równowaga redoks nabłonka jelitowego ma kluczowe znaczenie dla funkcjonowania tego narządu pod względem proliferacji komórek macierzystych (Cao i in., 2018). Wysoki współczynnik proliferujących komórek w jelicie czczym, obserwowany w prezentowanych badaniach, może być związany z działaniem antyoksydacyjnym AST. Zatem działanie antyoksydacyjne AST pomaga utrzymać równowagę redoks niezbędną do proliferacji komórek jelitowych, podczas gdy kwas laurynowy obecny w mączce HI bezpośrednio ją stymuluje.

Analiza ekspresji białek połączeń ścisłych w jelicie czczym wykazała, że najwyższe ich poziomy występowali w grupie bez dodatków (Wykres 4). Wykazano, że dodatek mączki HI łącznie z AST znacząco wpływał na poziom klaudyny 1. Ekspresja klaudyny 1 w grupie kontrolnej była wyższa niż w grupach 2,5% HI ($P < 0,001$), 5% HI ($P < 0,05$) oraz z samym dodatkiem AST ($P < 0,001$). Grupa 5% HI wykazywała przy tym wyższą ekspresję klaudyny 1 niż grupa 2,5% HI ($P < 0,05$). W grupie z samą AST ekspresja klaudyny 1 była niższa w porównaniu do grup 5% HI z AST ($P < 0,01$) i 2,5% HI z AST ($P < 0,001$). Wskazuje to na zmniejszenie ekspresji klaudyny 1 pod wpływem AST. W przypadku klaudyny 5 również wystąpiła istotna interakcja pomiędzy czynnikami doświadczalnymi. Dla klaudyny 5 zaobserwowano istotnie wyższy poziom ekspresji w grupie bez dodatków niż w grupach 2,5% HI ($P < 0,01$), 5% HI ($P < 0,001$) i z samą AST ($P < 0,01$). Ponadto ekspresja klaudyny 5 była wyższa w grupie 2,5% HI z AST w porównaniu do 2,5% HI ($P < 0,05$) oraz w grupie 5% HI

z AST w stosunku do 5% HI ($P < 0,05$). Wyniki te wskazują na negatywne działanie HI na poziom ekspresji kladyny 5. Zauważono także interakcję między czynnikami w ekspresji okladyny. Była ona najwyższa w grupie bez dodatków w porównaniu z grupami 2,5% HI, 5% HI i z samym AST (wszystkie $P < 0,001$). W grupach 2,5% HI i 5% HI ekspresja okladyny była wyższa niż w odpowiednich grupach z dodatkiem AST ($P < 0,001$). Dodatkowo grupa 2,5% HI z AST wykazywała wyższą ekspresję okladyny niż grupa z samym AST ($P < 0,05$).

Do oceny białek połączeń ścisłych (TJ) wybrano odcinek jelita czzego, ponieważ obszar ten ma kluczowe znaczenie dla wchłaniania składników odżywcznych (Bovera i in., 2018). Utrzymanie integralności jelit jest niezwykle ważne dla prawidłowego trawienia i wchłaniania składników odżywcznych u prosiąt a bariera nabłonkowa utworzona przez połączenia międzykomórkowe, takie jak TJ, oddziela mikroorganizmy bytujące w przewodzie pokarmowym od głębszych tkanek organizmu, zapobiegając translokacji patogenów (Biasato i in., 2019; Paradis i in., 2021). Niektóre kladyny tworzą jonoselektywne pory parakomórkowe, podczas gdy okladyna oddziałuje z białkami sygnalizacyjnymi, wpływając na sygnalizację ERK i dysocjację połączeń indukowaną przez TGF- β (Paradis i in., 2021; Shan i in., 2023; Zihni i in., 2016). Cytowane powyżej publikacje wskazują na zwiększenie ekspresji TJ pod wpływem mączki HI, jednak w większości były to analizy na poziomie mRNA lub po indukowanym zakażeniu bakteryjnym. W prezentowanych badaniach stwierdzono, że mączka HI zmniejszyła ekspresję wybranych białek połączeń ścisłych, jednak zaobserwowano niewielki wpływ AST na ekspresję kladyny 5 w jelcie czzym. Białka TJ są powiązane ze szlakiem sygnałowym NF- κ B, a cytokiny, takie jak IFN- γ i TNF- α , prowadzą do zmniejszenia ich poziomu. AST zmniejsza ekspresję czynników zapalnych, hamując aktywację NF- κ B, co chroni integralność błony śluzowej. Wcześniejsze prace potwierdziły, że właściwości przeciwwzapalne AST przywracają ekspresję białka TJ w endometrium bydła po narażeniu na LPS (Chen i in., 2021).

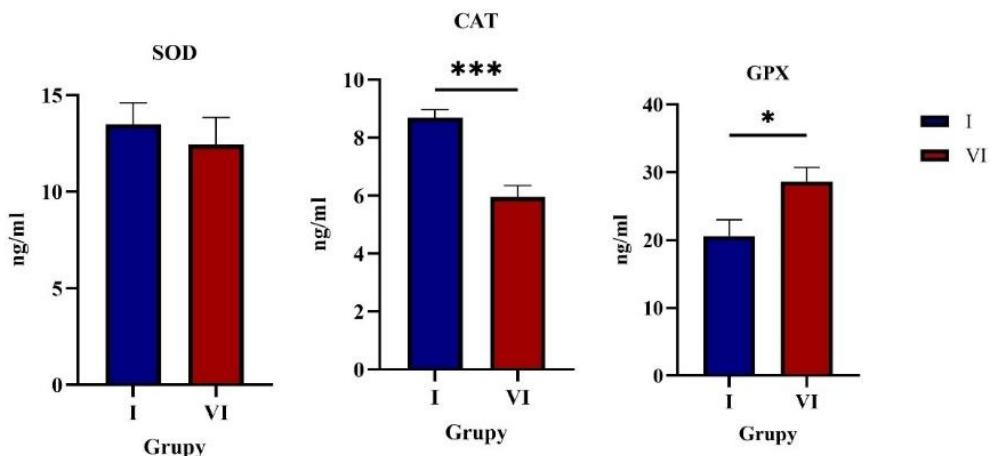


Wykres 4. Wpływ suplementacji paszy mączką z larw *Hermetia illucens* (HI) oraz astaksantyną (AST) na stopień proliferacji enterocytów w kryptach jelita cienkiego i ekspresję białek połączeń ścisłych (P2)

Skróty: AST(-) – brak dodatku astaksantyny, AST(+) – dodatek astaksantyny; 0HI, 2,5HI, 5HI – dodatek mączki z *Hermetia illucens* odpowiednio w ilości 0, 2,5 lub 5%. Słupki przedstawiają średnie dla grupy, a wąsy - SEM. *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001.

6.4. Protekcyjne działanie astaksantyny w ograniczaniu skutków stresu oksydacyjnego

Do przeprowadzenia oceny efektywności AST w ochronie organizmu przed stresem oksydacyjnym wykorzystano dwie grupy prosiąt: grupę I (kontrolną), pozbawioną dodatków paszowych oraz grupę VI, która żywiona była paszą z udziałem AST. Aktywność antyoksydacyjną samej AST potwierdzono testami DPPH oraz FRAP (**P2**). Analiza ELISA wykazała zwiększone stężenie GPX i zmniejszone CAT w grupie otrzymującej dodatek AST ($P < 0,05$ i $P < 0,01$) oraz brak istotnej różnicy pomiędzy grupami w poziomie SOD (Wykres 5). Na skutek walki ze stresem oksydacyjnym organizmy rozwinięły system obrony antyoksydacyjnej, w tym enzymy takie jak SOD, CAT i GPX. Dysmutaza ponadtlenkowa jest pierwszym enzymem detoksykacyjnym i najsilniejszym przeciwitleniaczem w komórce katalizującym dysmutację dwóch cząsteczek anionu ponadtlenkowego do nadtlenku wodoru i tlenu cząsteczkowego (Fridovich, 1995). Z kolei, peroksydaza glutationowa rozkłada nadtlenki wodoru do wody oraz nadtlenki lipidów do odpowiadających im alkoholi. Dzięki swoim właściwościom odgrywa kluczową rolę w hamowaniu procesu peroksydacji lipidów (Dringen i in., 2005). Katalaza obecna w większości tkanek wymagających dostępności tlenu, wykorzystuje żelazo lub mangan jako kofaktor i katalizuje degradację lub redukcję nadtlenku wodoru do wody i tlenu cząsteczkowego, w konsekwencji kończąc proces detoksykacji współdziałając z SOD (Chelikani i in., 2004). Wyższe stężenia CAT i SOD sugerują, że organizm potrzebuje intensywniejszej reakcji tych enzymów w celu neutralizacji rodników ponadtlenkowych (Chien i in., 2003). W badaniu opisany w Rozprawie niższy poziom CAT w grupie otrzymującej dodatek AST wskazuje, że AST wykazuje prawdopodobnie równie silną zdolność neutralizowania ROS jak enzym CAT. Dlatego też AST może zmniejszyć stres oksydacyjny poprzez bezpośrednie neutralizacje reaktywnych form tlenu, zmniejszając potrzebę nadaktywności enzymów do wykonywania tej funkcji (Zhang i in., 2013). Z kolei, zwiększyły poziom GPX przy jednoczesnym spadku CAT może wynikać z różnicy ich działania (konieczność obecności kofaktora dla GPX), lokalizacji w komórce (GPX występuje głównie w mitochondriach i cytoplazmie, natomiast CAT jest obecna przede wszystkim w peroksysomach) oraz roli w ochronie antyoksydacyjnej. Stąd przypuszczenie, że AST może indukować specyficzną odpowiedź organizmu, w której wzrasta poziom GPX jako bardziej uniwersalnego mechanizmu ochronnego, podczas gdy stężenie CAT, zmniejsza się na skutek obniżenie zapotrzebowania na aktywność tego enzymu.



Wykres 5. Wpływ astaksantyny na stężenie enzymów oksydacyjnych. I - grupa kontrolna bez dodatku AST, VI - grupa z dodatkiem AST.

Słupki przedstawiają średnie dla grupy, a wąsy - SEM. *** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$.

W ramach realizacji badań przeprowadzono także ocenę wpływu astaksantyny na status zdrowotny wątroby prosiąt, uwzględniając zarówno histologię tkanki wątrobowej, jak i ekspresję genów związanych z funkcjonowaniem wątroby (geny kodujące białka receptorowe; związane z metabolizmem kwasów tłuszczykowych, lipidów, cukrów oraz cholesterolu, kodujące mechanizmy mitochondrialne i metabolizm egzogennych substancji chemicznych). Ponadto, analiza objęła geny bezpośrednio lub pośrednio związane z odkładaniem macierzy zewnątrzkomórkowej oraz z reakcjami immunologicznymi i ochroną antyoksydacyjną (**P3**). Stres związany z odsadzeniem oraz zwiększyły metabolizm u rosnących prosiąt prowadzi do licznych konsekwencji widocznych w różnych narządach, szczególnie w wątrobie. Połączenie między jelitami a wątrobą (oś jelitowo-wątrobową) często sprzyja przenikaniu patogenów do tkanki wątrobowej, co może powodować uszkodzenia hepatocytów. Astaksantyna, wykazująca silne właściwości antyoksydacyjne, wydała się obiecującym dodatkiem paszowym wspierającym ochronę wątroby co zostało niejako potwierdzone w wynikach tej części badań. Astaksantyna wykazuje również działanie przeciwzapalne i przeciwnowotworowe, a jako antyoksydant chroni komórki przed uszkodzeniami wywołanymi przez nadmiar wolnych rodników (Chen and Kotani, 2016). Stres oksydacyjny organizmu jest powiązany z różnymi schorzeniami wątroby, w tym ze zwłóknieniem. Znaczącą rolę w procesie zwłóknienia wątroby odgrywają komórki gwiazdziste (HSC) wraz z komórkami Kupffera i komórkami jednojądrowymi. Jedną z głównych przyczyn zwłóknienia jest aktywacja komórek HSC, które zaczynają produkować kolagen I, który jest jednym z ważniejszych składników macierzy zewnątrzkomórkowej (Friedman, 2000; Kisseleva and

Brenner, 2007; Poli, 2000; Sánchez-Valle i in., 2012). Wolne rodniki (ROS) będące produktami stresu oksydacyjnego, poprzez upośledzenie funkcji mitochondriów, mogą inicjować śmierć hepatocytów i promować wydzielanie mediatorów prozapalnych. W związku z tym uważa się, że ROS potencjalnie sprzyjają zwłóknieniu wątroby na skutek promowania śmierci hepatocytów bądź aktywacji komórek Kupffera (Jaeschke, 2011). Astaksantyna wykazuje działanie hepatoprotekcyjne w różnych modelach zwierzęcych, wykazując potencjał przeciwdziałania uszkodzeniom wątroby i zaburzeniom metabolicznym. Badania na gryzoniach podkreślają zdolność AST do łagodzenia hepatotoksyczności, zmniejszania stanu zapalnego, obniżania akumulacji lipidów i zmniejszania markerów uszkodzenia wątroby w surowicy (Liu i in., 2018; Yang i in., 2016). AST wykazuje korzystne działanie w przypadku uszkodzeń wątroby wywołanych stresem oksydacyjnym, łagodząc stan zapalny i wzmacniając reakcje antyoksydacyjne, o czym świadczy zmniejszenie stężenia cytokin prozapalnych i poziomów ROS. AST poprawia również metabolizm lipidów (Jia i in., 2016; Zhang i in., 2020). Podczas gdy dysfunkcje jelit u odsadzonych prosiąt są dobrze udokumentowane w literaturze naukowej, kwestia podatności wątroby na uszkodzenia w tym okresie pozostaje słabo zbadana. W tym czasie prosięta doświadczają intensywnego stresu oksydacyjnego, który dodatkowo negatywnie oddziałuje na ten narząd. Ta luka w pracach naukowych wskazuje, że dalsze badania nad ochronną rolą AST przed stresem oksydacyjnym w wątrobie odsadzonych prosiąt są niezbędne.

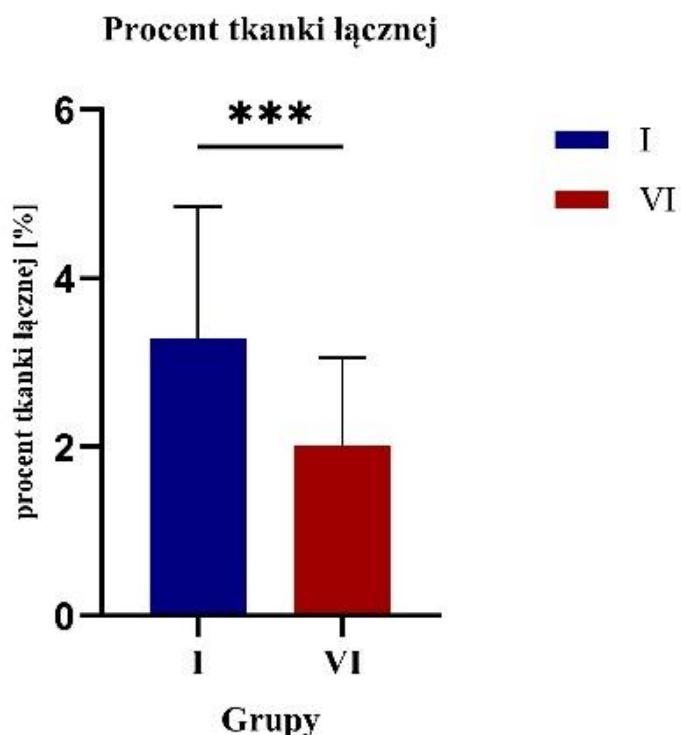
6.4.1. Wpływ astaksantyny na strukturę histologiczną tkanki wątroby

Analiza histologiczna tkanek wątroby wykazała, że dodanie AST znaczaco zmniejszyło ($P < 0,001$) odsetek włókien kolagenowych wokół zrazików wątroby (Wykres 6). W grupie I zaobserwowano brak typowych naczyń sinusoidalnych, co sugeruje zmiany w mikroarchitekturze wątroby. Ponadto, zauważono zmiany w kształcie hepatocytów, które straciły charakterystyczny wielokątny kontur, a ich struktura była zaburzona przez obrzęk komórkowy. W przeciwnieństwie do tego, w grupie suplementowanej AST, hepatocyty zachowały swój normalny wielokątny kształt, a naczynia sinusoidalne były wyraźnie widoczne, wskazując na ochronny efekt AST na strukturę tkanek wątroby oraz na zachowanie ich prawidłowej architektury (Rycina 3). W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano istotne różnice histologiczne między zwierzętami otrzymującymi dodatek AST w mieszanec paszowej a tymi z grupy kontrolnej – bez dodatku. W grupie suplementowanej AST stwierdzono znaczne zmniejszenie odkładania się włókien kolagenowych w tkance wątroby, co wskazuje na potencjalną rolę AST w ochronie przed nadmiernym gromadzeniem się kolagenu,

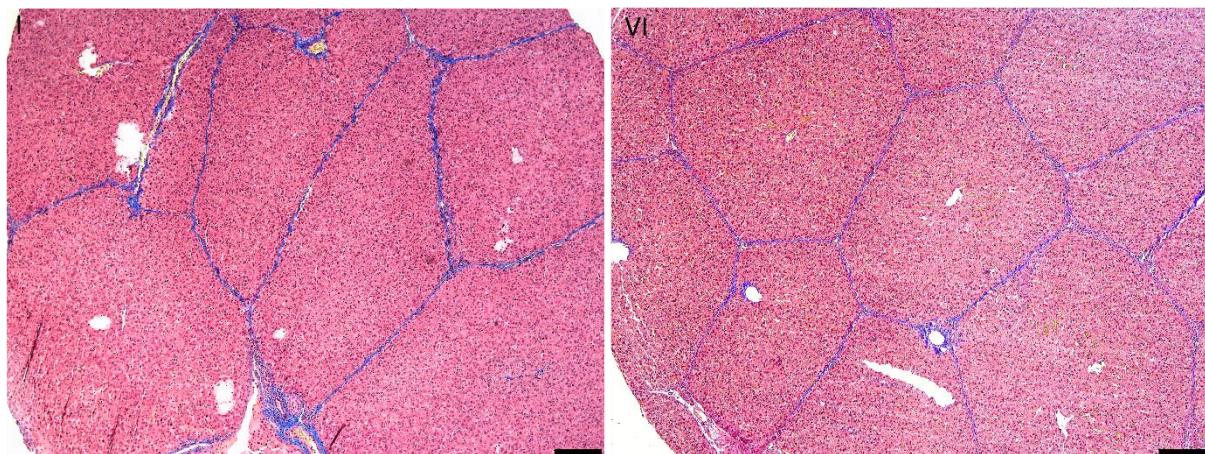
a w przypadku patologicznego czynnika - zwłóknenia. Zwłóknenie wątroby jest wynikiem nadmiernego gromadzenia się białek macierzy pozakomórkowej, głównie kolagenu, z powodu uszkodzenia i stanu zapalnego. Podstawowy mechanizm napędzający fibrogenezę w wątrobie obejmuje aktywację komórek gwiaździstych wątroby (HSC), w produkujące kolagen komórki miofibroblastopodobne (Kisseleva i Brenner, 2007; Wynn, 2007). Proces ten jest zaostrzany przez stres oksydacyjny, w którym reaktywne formy tlenu (ROS) uszkadzają hepatocyty, indukując stan zapalny i aktywując komórki Kupffera i HSC. Astaksantyna, znana ze swoich właściwości antyoksydacyjnych, wykazuje działanie ochronne na zdrowie wątroby, jak również hamuje aktywację HSC, zmniejsza produkcję ROS i zwiększa ekspresję Nrf2 (Chen i Kotani, 2016; Jiang i Török, 2013; Lieber, 2000; Yang i in., 2016).

6.4.2. Wpływ astaksantyny na ekspresję genów w tkance wątroby

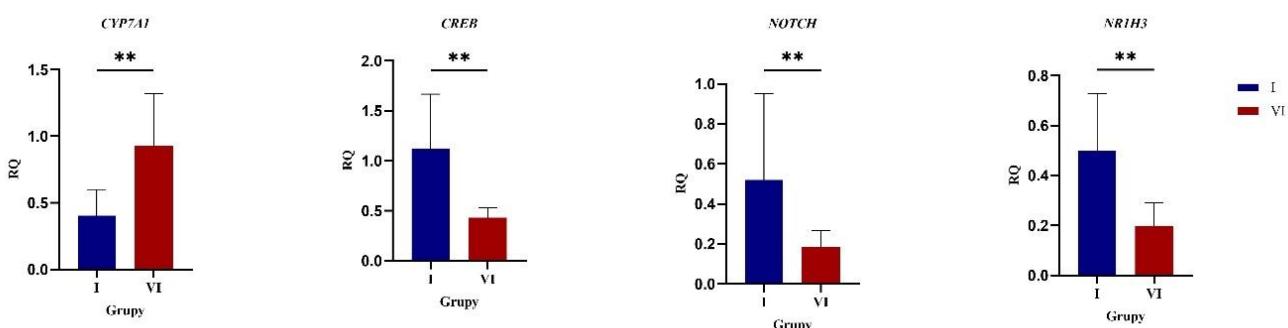
Analiza ekspresji genów wykazała, że suplementacja AST znacznie zwiększyła ekspresję *CYP7A1* ($P = 0,001$) i znacznie zmniejszyło poziomy ekspresji *CREB* ($P = 0,040$), *NOTCH1* ($P = 0,004$) i *NR1H3* ($P = 0,002$; Wykres 7). Nie stwierdzono jednak istotnych różnic między grupami w zakresie ekspresji *SREBF2*, *SIRT3*, *APOE*, *DHCR24*, *ACCA2*, *HK1*, *CXCL10*, *CYP1A1*, *COL1A2*, *SOD1* i *CAT*.



Wykres 6. Średni odsetek włókien kolagenowych w wątrobie w grupie I kontrolnej oraz w grupie VI z dodatkiem AST. ** $p \leq 0,01$. Słupki przedstawiają średnią, wąsy – SEM.



Rycina 3. Obraz mikroskopowy tkanki wątroby: I - grupa kontrolna bez dodatku AST, VI - grupa z dodatkiem AST. Powiększenie 4 \times , pasek skali = 200 μ m. Barwienie trójchromowe Massona-Goldnera z błękitem aniliny.



Wykres 7. Geny, których poziomy ekspresji różnią się statystycznie istotnie ($P < 0,05$) między dwiema badanymi grupami: I - grupa kontrolna bez dodatku AST, VI - grupa z dodatkiem AST. ** $p \leq 0,01$. Słupki przedstawiają średnie dla grupy, a wąsy - SD.

W prezentowanych badaniach sprawdzono wpływ AST na ekspresję genów, podkreślając kluczową rolę wątroby w metabolizmie lipidów. Otrzymane wyniki wykazały, że wątroba prosiąt żywionych paszą z dodatkiem AST charakteryzowała się obniżoną ekspresją genu *NRH3*, którego hamowanie może sprzyjać regeneracji hepatocytów po stłuszczeniu wątroby (Nakamura i in., 2009; Zhang i in., 2016). Zaobserwowano również zwiększoną ekspresję genu *CYP7A1*, który jest kluczowy dla metabolizmu cholesterolu i jego wydalania z wątroby poprzez syntezę kwasów żółciowych. Zmiany te sugerują, że AST może wspomagać procesy detoksykacyjne i homeostazę lipidową w wątrobie (Wang i in., 2022b). Ponadto, stwierdzono obniżenie ekspresji genów *NOTCH1* i *CREB*, jednak ich dokładna rola w procesie łagodzenia zwłóknienia wątroby pozostaje niejasna. W prezentowanym doświadczeniu

zauważalny był związek między niższą ekspresją *CREB* i niższą zawartością kolagenu w tkance wątroby prosiąt otrzymujących w paszy dodatek AST. Gen *CREB* wpływa na aktywację i proliferację komórek gwiaździstych, a także na stan zapalny. Ponadto badania wskazują, że gen *CREB* bierze udział w odkładaniu się macierzy pozakomórkowej i utracie komórek funkcjonalnych (Eng i Friedman, 2001; Li i in., 2018b). Z kolei, szlak sygnałowy *NOTCH* jest kluczowy dla adipogenezy, w tym proliferacji i różnicowania progenitorów adipocytów. Badania opisywane w literaturze podają, że haploinsuficjencja zwiększa akumulację tłuszczy i wiąże się z insulinoopornością, a w przypadku zwłóknienia wątroby udokumentowano aktywację *NOTCH* (Ferrando, 2009; Yamaguchi i in., 2021). Można więc wnioskować, że w oparciu o analizę ekspresji genów, AST wykazuje potencjał ochronny wobec wątroby.

Otrzymane wyniki przeprowadzonych chemicznych analiz właściwości antyoksydacyjnych AST (FRAP i DPPH) i immunoenzymatycznych w surowicy krwi, w połączeniu z rezultatami stwierdzonymi w analizie histologicznej i genomicznej tkanki wątroby, wykazały pewne aspekty protekcyjnego działania AST i interesującą możliwość wykorzystania tej naturalnej substancji jako prozdrowotnego dodatku do paszy dla prosiąt. Jednakże stosowanie AST w praktyce, opisanie zaobserwowanych niejasności oraz ustalenie optymalnej dawki AST, wymaga dalszych badań, szczególnie w warunkach produkcyjno-fermowych oraz na zwierzętach starszych.

7. Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że dodatek do paszy dla prosiąt mączki z larw *Hermetia illucens* (HI) nie wpływał negatywnie na wzrost, pobranie paszy ani status zdrowotny zwierząt. Suplementacja paszy astaksantyną (AST) również nie miała znaczącego wpływu na wyniki produkcyjne, natomiast ograniczyła stres oksydacyjny organizmu i poprawiła parametry krwi, takie jak poziom hemoglobiny i żelaza, które spadały przy wyższym udziale mączki HI w paszy. Analiza słoniny przechowywanej w zamrożeniu przez 3 miesiące wykazała, że dodatek do paszy AST razem z mączką HI obniżył poziom wskaźnika TBARS. Wynik ten wskazuje na możliwość wykorzystania tych dodatków jako skutecznego antyoksydantu, ograniczającego skutki peroksydacji lipidów w tkance tłuszczowej. W przypadku mięsa nie uzyskano tak wyraźnego efektu.

Analizy histologiczne wykazały, że jednoczesne podawanie AST wraz z mączką HI na poziomie 2,5% znacznie zwiększyło szerokość mięśniówka i jej warstw w dwunastnicy, co potencjalnie może przyczynić się do lepszej perystaltyki. Sama mączka HI na poziomie 2,5% wpłynęła na zwiększenie długości i szerokości kosmków, a podawana wraz z AST wpłynęła na polepszenie stosunku długości kosmków do głębokości krypt. W jelicie czczym widoczny był wpływ AST, która zwiększyła szerokość błony śluzowej, warstwy mięśni podłużnych, liczbę komórek kubkowych oraz długość kosmków. Zarówno w jelicie czczym, jak i krętym, widoczny był korzystny wpływ mączki HI na powierzchnię wchłaniania. Jest to związane m.in. z korzystnym wpływem mączki HI na jelito kręte, prowadzącym do wydłużenia kosmków. Wykazano zwiększoną proliferację komórek w kryptach dwunastnicy i jelita czczego, zwłaszcza w grupie otrzymującej 2,5% HI. Jednak mączka HI nie wpłynęła na ekspresję białek połączeń ścisłych.

Suplementacja paszy astaksantyną zmniejszyła odkładanie włókien kolagenowych w tkance wątroby prosiąt, co sugeruje potencjalną rolę tego dodatku w ochronie przed zwłóknieniem. Ponadto, zmniejszenie ekspresji genu *NR1H3* oraz zwiększenie ekspresji genu *CYP7A1* wskazuje na poprawę regeneracji hepatocytów i metabolizmu cholesterolu u prosiąt żywionych paszą z udziałem AST. Obniżona ekspresja genów *NOTCH1* i *CREB* była powiązana z redukcją ilości kolagenu w wątrobie, choć rola tych genów w ograniczaniu zwłóknienia wątroby pozostaje niejasna. Uzyskane wyniki podkreśliły rolę AST w utrzymaniu homeostazy lipidowej i procesach detoksykacyjnych organizmu prosiąt.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań, można stwierdzić, że suplementacja paszy dla prosiąt w okresie okołoodsadzeniowym mączką HI i AST może stanowić cenne uzupełnienie diety prosiąt, poprawiając strukturę i funkcjonowanie jelit i wątroby, wspierając status zdrowotny oraz stabilność oksydacyjną tkanki tłuszczowej, bez negatywnego wpływu na wskaźniki produkcyjne zwierząt.

8. Wnioski

1. Dodatek 2,5% mączki HI oraz AST podawane łącznie, mają pozytywny wpływ na strukturę jelit, co potencjalnie sprzyja lepszemu wchłanianiu składników odżywczych u prosiąt.
2. Dodatek 2,5% mączki HI oraz AST, stosowane w mieszance paszowej oddziennie lub razem, mogą zmniejszyć podatność tłuszczu wieprzowego na proces utleniania i wydłużyć jego trwałość.
3. Stosowanie mączki HI i AST nie wpływa negatywnie na wskaźniki produkcyjne i status zdrowotny odsadzonych prosiąt.
4. Astaksantyna stosowana jako dodatek paszowy dla prosiąt pełni rolę ochronną przed zwłóknieniem wątroby, przyczynia się do poprawy regeneracji hepatocytów i metabolizmu cholesterolu oraz detoksykacji organizmu.

9. Bibliografia

- 1) Arefpour, H., Rasaei, N., Amini, M. R., Salavatizadeh, M., Hashemi, M., Makhtoomi, M., Hajiaqaei, M., Gholizadeh, M., Askarpour, M., Hekmatdoost, A. (2024). The effects of astaxanthin supplementation on liver enzyme levels: A systematic review and meta-analysis. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 94(5–6), 434–442. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000804>
- 2) Akduman, H., Tayman, C., Korkmaz, V., Akduman, F., Fettah, N.D., Gürsoy, B.K., Turkmenoglu, T.T., Çağlayan, M. (2022). Astaxanthin Reduces the Severity of Intestinal Damage in a Neonatal Rat Model of Necrotizing Enterocolitis. *American Journal of Perinatology*, 39(16), 1820-1827. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1727156>
- 3) Alfhili, M. A., & Aljuraiban, G. S. (2021). Lauric acid, a dietary saturated medium-chain fatty acid, elicits calcium-dependent eryptosis. *Cells*, 10(12), 3388. <https://doi.org/10.3390/cells10123388>
- 4) Allameh, A., Niayesh-Mehr, R., Aliarab, A., Sebastiani, G., & Pantopoulos, K. (2023). Oxidative stress in liver pathophysiology and disease. *Antioxidants*, 12(9), 1653. <https://doi.org/10.3390/antiox12091653>
- 5) AOAC. Association of Oficial Analytical Chemists, 2009. Official methods of analysis of AOAC International. 18th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, The Journal of Nutrition.
- 6) Arrieta, M. C., Bistritz, L., & Meddings, J. B. (2006). Alterations in intestinal permeability. *Gut*, 55(10), 1512-1520. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.085373>
- 7) Asmar, R. El, Panigrahi, P., Bamford, P., Berti, I., Not, T., Coppa, G. V., Catassi, C., Fasano, A. (2002). Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology*, 123(5), 1607-1615. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.36578>
- 8) Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- 9) Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Karlsson, S. M., Steingrímsson, O., & Thormar, H. (1998). In vitro inactivation of Chlamydia trachomatis by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(9), 2290-2294. <https://doi.org/10.1128/aac.42.9.2290>
- 10) Bergsson, G., Steingrímsson, O., & Thormar, H. (1999). In vitro susceptibilities of Neisseria gonorrhoeae to fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(11), 2790-2792. <https://doi.org/10.1128/aac.43.11.2790>
- 11) Bergstrom, J.R., Houser, T.A., Gunderson, J.A., Gipe, A.N., Jacela, J., Benz, J.M., Sulabo, R.C., Nelssen, J.L., Tokach, M.D (2009). Effects of dietary astaxanthin on the growth performance and carcass characteristics of finishing pigs (2009). *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, (10), 239-244. <https://doi.org/10.4148/2378-5977.6783>
- 12) Biasato, I., Renna, M., Gai, F., Dabbou, S., Meneguz, M., Perona, G., Martinez, S., Lajusticia, A.C.B., Bergagna, S., Sardi, L., Capucchio, M.T., Bressan, E., Dama, A., Schiavone, A., Gasco, L. (2019). Partially defatted black soldier fly larva meal inclusion in piglet diets: Effects on the growth performance, nutrient digestibility, blood profile, gut morphology and histological features. *Journal of animal science and biotechnology*, 10, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0325-x>
- 13) Boudry, G., Péron, V., Le Huerou-Luron, I., Lalles, J. P., & Seve, B. (2004). Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *The Journal of nutrition*, 134(9), 2256-2262. <https://doi.org/10.1093/jn/134.9.2256>

- 14) Bovera, F., Loponte, R., Pero, M.E., Cutrignelli, M.I., Calabò, S., Musco, N., Vassalotti, G., Panettieri, V., Lombardi, P., Piccolo, G., Di Meo, C., Siddi, G., Fliegerova, K., Moniello, G. (2018). Laying performance, blood profiles, nutrient digestibility and inner organs traits of hens fed an insect meal from *Hermetia illucens* larvae. Research in Veterinary Science, 120, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.09.006>
- 15) Brooks, P. H., & Tsouagliannis, C. A. (2003). Factors affecting the voluntary feed intake of the weaned pig. In Weaning the pig, 6, 81-116. https://doi.org/10.3920/9789086865130_007
- 16) Buchet, A., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M., & Merlot, E. (2017). Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs. PLoS One, 12(5), e0178487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178487>
- 17) Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., & Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Developmental & Comparative Immunology, 23(4-5), 329-344. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(99\)00015-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(99)00015-4)
- 18) Bulet, P., & Stocklin, R. (2005). Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. Protein and peptide letters, 12(1), 3-11. <https://doi.org/10.2174/0929866053406011>
- 19) Campbell, J., Berry, J., & Liang, Y. (2019). Anatomy and physiology of the small intestine. In Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2, 817-841. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00071-6>
- 20) Campbell, J. M., Crenshaw, J. D., & Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. Journal of animal science and biotechnology, 4(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-19>
- 21) Cao, S. T., Wang, C. C., Wu, H., Zhang, Q. H., Jiao, L. F., & Hu, C. H. (2018). Weaning disrupts intestinal antioxidant status, impairs intestinal barrier and mitochondrial function, and triggers mitophagy in piglets. Journal of animal science, 96(3), 1073-1083. <https://doi.org/10.1093/jas/skx062>
- 22) Carr, C. C., Johnson, D. D., Brendemuhl, J. H., & Gonzalez, J. M. (2010). Fresh pork quality and shelf-life characteristics of meat from pigs supplemented with natural astaxanthin in the diet. The Professional Animal Scientist, 26(1), 18-25. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30554-4](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30554-4)
- 23) Chen, J. T., & Kotani, K. (2016). Astaxanthin as a potential protector of liver function: A review. Journal of Clinical Medicine Research, 8(10), 701. <https://doi.org/10.14740/jocmr2672w>
- 24) Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. Cellular and Molecular Life Sciences CMSL, 61, 192-208. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- 25) Chia, S. Y., Tanga, C. M., Osuga, I. M., Alaru, A. O., Mwangi, D. M., Githinji, M., Dubois, T., Ekesi, S., van Loon, J. J. A., Dicke, M. (2021). Black soldier fly larval meal in feed enhances growth performance, carcass yield and meat quality of finishing pigs. Journal of Insects as Food and Feed, 7(4), 433-447. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0072>
- 26) Chien, Y. H., Pan, C. H., & Hunter, B. (2003). The resistance to physical stresses by *Penaeus monodon* juveniles fed diets supplemented with astaxanthin. Aquaculture, 216(1-4), 177-191. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00056-X)
- 27) Choi, H. D., Youn, Y. K., & Shin, W. G. (2011). Positive effects of astaxanthin on lipid profiles and oxidative stress in overweight subjects. Plant foods for human nutrition, 66, 363-369. <https://doi.org/10.1007/s11130-011-0258-9>
- 28) Ding, S., Cheng, Y., Azad, M. A. K., Zhu, Q., Huang, P., & Kong, X. (2022). Developmental changes of immunity and different responses to weaning stress of Chinese indigenous piglets and Duroc piglets during suckling and weaning periods. International Journal of Molecular Sciences, 23(24), 15781. <https://doi.org/10.3390/ijms232415781>

- 29) Dringen, R., Pawlowski, P. G., & Hirrlinger, J. (2005). Peroxide detoxification by brain cells. *Journal of neuroscience research*, 79(1-2), 157-165. <https://doi.org/10.1002/jnr.20280>
- 30) Ebenhan, T., Gheysens, O., Kruger, H. G., Zeevaart, J. R., & Sathékége, M. M. (2014). Antimicrobial peptides: Their role as infection-selective tracers for molecular imaging. *BioMed research international*, 2014(1), 867381. <https://doi.org/10.1155/2014/867381>
- 31) Ekpe, L., Inaku, K., & Ekpe, V. (2018). Antioxidant effects of astaxanthin in various diseases—A review. *J. Mol. Pathophysiol*, 7(1), 1-6. <https://doi.org/10.5455/oams.20180315075538>
- 32) Elhag, O., Zhou, D., Song, Q., Soomro, A.A., Cai, M., Zheng, L., Yu, Z., Zhang, J. (2017). Screening, expression, purification and functional characterization of novel antimicrobial peptide genes from *Hermetia illucens* (L.). *PloS one*, 12(1), e0169582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169582>
- 33) Elsayed, M., Li, W., Abdalla, N. S., Ai, P., Zhang, Y., & Abomohra, A. E. F. (2022). Innovative approach for rapeseed straw recycling using black soldier fly larvae: Towards enhanced energy recovery. *Renewable Energy*, 188, 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.02.029>
- 34) Eng, F. J., & Friedman, S. L. (2001). Transcriptional regulation in hepatic stellate cells. In *Seminars in liver disease*, 21(03), 385-396. <https://doi.org/10.1055/s-2001-17553>
- 35) Enig, M. G. (2017). Lauric oils as antimicrobial agents: theory of effect, scientific rationale, and dietary application as adjunct nutritional support for HIV-infected individuals. In *Nutrients and Foods in AIDS* 81-97. <https://doi.org/10.1201/9780203745250-5>
- 36) Ferrando, A. A. (2009). The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *ASH Education Program Book*, 2009(1), 353-361. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.353>
- 37) Ferronato, G., & Prandini, A. (2020). Dietary supplementation of inorganic, organic, and fatty acids in pig: A review. *Animals*, 10(10), 1740. <https://doi.org/10.3390/ani10101740>
- 38) Fridovich, I. (1981). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach*, 250-272.
- 39) Friedman, S. L. (2000). Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*, 275(4), 2247-2250. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2247>
- 40) Galbraith, H., Miller, T. B., Paton, A. M., & Thompson, J. K. (1971). Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *Journal of applied Bacteriology*, 34(4), 803-813. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1971.tb01019.x>
- 41) Grela, E.R., S.J., 2022. Zalecenia żywieniowe i wartość pokarmowa pasz dla świń. Normy żywienia świń. Wyd. Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna.
- 42) Hampson, D. J. (1986). Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in veterinary science*, 40(1), 32-40. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)30482-x](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)30482-x)
- 43) Han, K. N., Kwon, I. K., Lohakare, J. D., Heo, S., & Chae, B. J. (2007). Chito-oligosaccharides as an alternative to antimicrobials in improving performance, digestibility and microbial ecology of the gut in weanling pigs. *Asian-australasian journal of animal sciences*, 20(4), 556-562. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.556>
- 44) Hanczakowska, E., Księżak, J., & Świątkiewicz, M. (2018). Efficiency of pea seeds in sow, piglet and fattener feeding. *Animal Production Science*, 59(2), 304-313. <https://doi.org/10.1071/AN17487>
- 45) Hanczakowska, E., Księżak, J., & Świątkiewicz, M. (2017). Efficiency of lupine seed (*Lupinus angustifolium* and *Lupinus luteus*) in sow, piglet and fattener feeding. *Agricultural and Food Science*, 26(1), 1-15. <https://doi.org/10.23986/afsci.59407>

- 46) Hanczakowska, E., & Świątkiewicz, M. (2014). Legume seeds and rapeseed press cake as replacers of soybean meal in feed for fattening pigs. *Annals of Animal Science*, 14(4), 921-934. <https://doi.org/10.2478/aoas-2014-0068>
- 47) Hay, M., Orgeur, P., Lévy, F., Le Dividich, J., Concorde, D., Nowak, R., Mormède, P. (2001). Neuroendocrine consequences of very early weaning in swine. *Physiology & behavior*, 72(1-2), 263-269. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00404-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00404-2)
- 48) Hoffmann, J. A., & Hetru, C. (1992). Insect defensins: inducible antibacterial peptides. *Immunology today*, 13(10), 411-415. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(92\)90092-L](https://doi.org/10.1016/0167-5699(92)90092-L)
- 49) Håkenåsen, I. M., Grepperud, G. H., Hansen, J. Ø., Øverland, M., Ånestad, R. M., & Mydland, L. T. (2021). Full-fat insect meal in pelleted diets for weaned piglets: effects on growth performance, nutrient digestibility, gastrointestinal function, and microbiota. *Animal Feed Science and Technology*, 281, 115086. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115086>
- 50) Hong, J., & Kim, Y. Y. (2022). Insect as feed ingredients for pigs. *Animal bioscience*, 35(2), 347. <https://doi.org/10.5713/ab.21.0475>
- 51) Hułas-Stasiak, M., Jakubowicz-Gil, J., Dobrowolski, P., Grzesiak, M., Muszyński, S., Świątkiewicz, M., & Tomaszewska, E. (2020). Regulation of folliculogenesis by growth factors in piglet ovary exposed prenatally to β -hydroxy- β -methylbutyrate (HMB). *Annals of Animal Science*, 20(3), 899-917. <https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0026>
- 52) Igielska-Kalwat, J., Gościańska, J., & Nowak, I. (2015). Karotenoidy jako naturalne antyoksydanty. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postępy Higieny i Medycyny Doswiadczałnej*, 69. DOI: 10.5604/17322693.1148335
- 53) Inborr, J.; Lignell, Å. (1997). Effect of feeding astaxanthin-rich algae meal (*Haematococcus pluvialis*) on performance and carotenoid concentration of different tissues of broiler chickens. In Proceedings of the 13th WPSA Conference on Poultry Meat Quality in Poznan, Poland, 39–43.
- 54) Ipema, A. F., Bokkers, E. A., Gerrits, W. J., Kemp, B., & Bolhuis, J. E. (2021). Providing live black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) improves welfare while maintaining performance of piglets post-weaning. *Scientific Reports*, 11(1), 7371. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86765-3>
- 55) Jaeschke, H. (2011). Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: present concepts. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 26, 173-179. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06592.x>
- 56) Jeong, J. S., & Kim, I. H. (2014). Effect of astaxanthin produced by *Phaffia rhodozyma* on growth performance, meat quality, and fecal noxious gas emission in broilers. *Poultry science*, 93(12), 3138-3144. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03847>
- 57) Jia, Y., Wu, C., Kim, J., Kim, B., & Lee, S. J. (2016). Astaxanthin reduces hepatic lipid accumulations in high-fat-fed C57BL/6J mice via activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and inhibition of PPAR gamma and Akt. *The Journal of nutritional biochemistry*, 28, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.09.015>
- 58) Jiang, J. X., & Török, N. J. (2013). Liver injury and the activation of the hepatic myofibroblasts. *Current pathobiology reports*, 1, 215-223. <https://doi.org/10.1007/s40139-013-0019-6>
- 59) Jin, X., Yuan, B., Liu, M., Zhu, M., Zhang, X., Xie, G., Wu, W., Wang, Z., Xu, H., Lv, Y., Huang, Y., Wang, W. (2021). Dietary *Hermetia illucens* Larvae Replacement Alleviates Diarrhea and Improves Intestinal Barrier Function in Weaned Piglets Challenged With Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 746224. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.746224>

- 60) Jozefiak, A., & Engberg, R. M. (2017). Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*, 26(2), 87-99. <https://doi.org/10.22358/jafs/69998/2017>
- 61) Józefiak, D., Józefiak, A., Kierończyk, B., Rawski, M., Świątkiewicz, S., Długosz, J., & Engberg, R. M. (2016). 1. Insects—a natural nutrient source for poultry—a review. *Annals of Animal Science*, 16(2), 297-313. <https://doi.org/10.1515/aoas-2016-0010>
- 62) Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., & Truant, J. P. (1972). Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2(1), 23-28. <https://doi.org/10.1128/AAC.2.1.23>
- 63) Kaczor, M., Bulak, P., Proc-Pietrycha, K., Kirichenko-Babko, M., & Bieganowski, A. (2022). The variety of applications of Hermetia illucens in industrial and agricultural areas. *Biology*, 12(1), 25. <https://doi.org/10.3390/biology12010025>
- 64) Kierończyk, B., Rawski, M., Mikołajczak, Z., Homska, N., Jankowski, J., Ognik, K., Józefiak, A., Mazurkiewicz, J., Józefiak, D. (2022). Available for millions of years but discovered through the last decade: Insects as a source of nutrients and energy in animal diets. *Animal Nutrition*, 11, 60-79. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.06.015>
- 65) Kil, D. Y., & Stein, H. H. (2010). Board invited review: management and feeding strategies to ameliorate the impact of removing antibiotic growth promoters from diets fed to weanling pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 90(4), 447-460. <https://doi.org/10.4141/cjas10028>
- 66) Kim, S.H., Kim, H. (2019). Astaxanthin Modulation of Signaling Pathways That Regulate Autophagy. *Mar Drugs* 17, 546. <https://doi.org/10.3390/md17100546>
- 67) Kisielinski, K., Willis, S., Prescher, A., Klosterhalfen, B., & Schumpelick, V. (2002). A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clinical and experimental medicine*, 2, 131-135. <https://doi.org/10.1007/s102380200018>
- 68) Kisseleva, T., & Brenner, D. A. (2007). Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal of fibrosis. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 22, S73-S78. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2006.04658.x>
- 69) Lallès, J. P., Bosi, P., Smidt, H., & Stokes, C. R. (2007a). Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(2), 260-268. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005484>
- 70) Lallès, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R. (2007b). Weaning — A challenge to gut physiologists. *Livest Sci* 108, 82–93. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.091>
- 71) Lang, F., Abed, M., Lang, E., & Föller, M. (2014). Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxidants & redox signaling*, 21(1), 138-153. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5747>
- 72) Lata, S., Sharma, B. K., & Raghava, G. P. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. *BMC bioinformatics*, 8, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-263>
- 73) Lee, J., Kim, M. H., & Kim, H. (2022). Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of astaxanthin on gastrointestinal diseases. *International journal of molecular sciences*, 23(24), 15471. <https://doi.org/10.3390/ijms232415471>
- 74) Lei, Y., & Kim, I. H. (2014). Effect of Phaffia rhodozyma on performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and meat quality in finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 92(1), 171-176. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6749>
- 75) Lestingi, A. (2024). Alternative and Sustainable Protein Sources in Pig Diet: A Review. *Animals*, 14(2), 310. <https://doi.org/10.3390/ani14020310>
- 76) Li, R., Xin, T., Li, D., Wang, C., Zhu, H., & Zhou, H. (2018a). Therapeutic effect of Sirtuin 3 on ameliorating nonalcoholic fatty liver disease: the role of the ERK-CREB pathway and Bnip3-mediated mitophagy. *Redox Biology*, 18, 229-243. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.07.011>

- 77) Li, Y., Guo, Y., Wen, Z., Jiang, X., Ma, X., & Han, X. (2018b). Weaning stress perturbs gut microbiome and its metabolic profile in piglets. *Scientific reports*, 8(1), 18068. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33649-8>
- 78) Lieber, C. S. (2000). Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *Journal of hepatology*, 32, 113-128. [https://doi.org/10.1016/S0168-8278\(00\)80420-1](https://doi.org/10.1016/S0168-8278(00)80420-1)
- 79) Lieberman, S., Enig, M. G., & Preuss, H. G. (2006). A review of monolaurin and lauric acid: natural virucidal and bactericidal agents. *Alternative & Complementary Therapies*, 12(6), 310-314. <https://doi.org/10.1089/act.2006.12.310>
- 80) Liu, H., Liu, M., Fu, X., Zhang, Z., Zhu, L., Zheng, X., & Liu, J. (2018). Astaxanthin prevents alcoholic fatty liver disease by modulating mouse gut microbiota. *Nutrients*, 10(9), 1298. <https://doi.org/10.3390/nu10091298>
- 81) Liu, Z., Xie, W., Zan, G., Gao, C., Yan, H., Zhou, J., Wang, X. (2021). Lauric acid alleviates deoxynivalenol-induced intestinal stem cell damage by potentiating the Akt/mTORC1/S6K1 signaling axis. *Chem Biol Interact* 348, 109640. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109640>
- 82) Loponte, R., Nizza, S., Bovera, F., De Riu, N., Fliegerova, K., Lombardi, P., Vassalotti, G., Mastellone, V., Nizza, A., Moniello, G. (2017). Growth performance, blood profiles and carcass traits of Barbary partridge (*Alectoris barbara*) fed two different insect larvae meals (*Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens*). *Research in Veterinary Science*, 115, 183-188. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.04.017>
- 83) Lu, S., Taethaisong, N., Meethip, W., Surakhunthod, J., Sinpru, B., Sroichak, T., Archa, P., Thongpea, S., Paengkoum, S., Purba, R.A.P., Paengkoum, P. (2022). Nutritional Composition of Black Soldier Fly Larvae (*Hermetia illucens* L.) and Its Potential Uses as Alternative Protein Sources in Animal Diets: A Review. *Insects*, 13(9), 831. <https://doi.org/10.3390/insects13090831>
- 84) Luo, Z., Zhu, W., Guo, Q., Luo, W., Zhang, J., Xu, W., & Xu, J. (2016). Weaning induced hepatic oxidative stress, apoptosis, and aminotransferases through MAPK signaling pathways in piglets. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016(1), 4768541. <https://doi.org/10.1155/2016/4768541>
- 85) Macedo, R. C., Bolin, A. P., Marin, D. P., & Otton, R. (2010). Astaxanthin addition improves human neutrophils function: in vitro study. *European Journal of Nutrition*, 49, 447-457. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0103-1>
- 86) Marono, S., Loponte, R., Lombardi, P., Vassalotti, G., Pero, M.E., Russo, F., Gasco, L., Parisi, G., Piccolo, G., Nizza, S., Di Meo, C., Attia, Y.A., Bovera, F. (2017). Productive performance and blood profiles of laying hens fed *Hermetia illucens* larvae meal as total replacement of soybean meal from 24 to 45 weeks of age. *Poultry science*, 96(6), 1783-1790. <https://doi.org/10.3382/ps/pew461>
- 87) Medic, J., Atkinson, C., & Hburgh, C. R. (2014). Current knowledge in soybean composition. *Journal of the American oil chemists' society*, 91, 363-384. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2407-9>
- 88) Miki, W. (1991). Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure and applied chemistry*, 63(1), 141-146. <https://doi.org/10.1351/pac199163010141>
- 89) Mikołajczak, Z., Mazurkiewicz, J., Rawski, M., Kierończyk, B., Józefiak, A., Swiatkiewicz, S., Józefiak, D., 2023. Black Soldier Fly Full-Fat Meal in Atlantic Salmon Nutrition - Part B: Effects on Growth Performance, Feed Utilization, Selected Nutriphysiological Traits and Production Sustainability in Pre-Smots. *Annals of Animal Science* 23. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0071>

- 90) Mooli, R. G. R., Mukhi, D., & Ramakrishnan, S. K. (2022). Oxidative stress and redox signaling in the pathophysiology of liver diseases. *Comprehensive Physiology*, 12(2), 3167. <https://doi.org/10.1002/cphy.c200021>
- 91) Moretta, A., Salvia, R., Scieuzzo, C., Di Somma, A., Vogel, H., Pucci, P., Sgambato, A., Wolff, M., Falabella, P. (2020). A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the Black Soldier Fly (BSF) *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Scientific reports*, 10(1), 16875. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74017-9>
- 92) Müller, A., Wolf, D., & Gutzeit, H. O. (2017). The black soldier fly, *Hermetia illucens*—a promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 72(9-10), 351-363. <https://doi.org/10.1515/znc-2017-0030>
- 93) Mylonakis, E., Podsiadlowski, L., Muhammed, M., & Vilcinskas, A. (2016). Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1695), 20150290. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0290>
- 94) Nakamura, M., Fujino, T., Yada, R., Yada, M., Yasutake, K., Yoshimoto, T., Harada, N., Higuchi, N., Kato, M., Kohjima, M., Taketomi, A., Maehara, Y., Nakashima, M., Kotoh, K., Enjoji, M. (2009). Impact of cholesterol metabolism and the LX α -SREBP-1c pathway on nonalcoholic fatty liver disease. *International journal of molecular medicine*, 23(5), 603-608. https://doi.org/10.3892/ijmm_00000170
- 95) Negroni, A., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2015). Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediators of inflammation*, 2015(1), 250762. <https://doi.org/10.1155/2015/250762>
- 96) Nadathur, S. R., Wanasundara, J. P. D., & Scanlin, L. (2017). Proteins in the diet: Challenges in feeding the global population. In *Sustainable protein sources* (pp. 1-19). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802778-3.00001-9>
- 97) Nussey, D. H., Pemberton, J. M., Pilkington, J. G., & Blount, J. D. (2009). Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Functional Ecology*, 809-817. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01555.x>
- 98) Paradis, T., Bègue, H., Basmaciyan, L., Dalle, F., & Bon, F. (2021). Tight junctions as a key for pathogens invasion in intestinal epithelial cells. *International journal of molecular sciences*, 22(5), 2506. <https://doi.org/10.3390/ijms22052506>
- 99) Park, J. S., Chyun, J. H., Kim, Y. K., Line, L. L., & Chew, B. P. (2010). Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans. *Nutrition & metabolism*, 7, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-18>
- 100) Park, S. I., Kim, J. W., & Yoe, S. M. (2015). Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Developmental & Comparative Immunology*, 52(1), 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.04.018>
- 101) Park, S. I., & Yoe, S. M. (2017). Defensin-like peptide3 from black solder fly: Identification, characterization, and key amino acids for anti-Gram-negative bacteria. *Entomological research*, 47(1), 41-47. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12214>
- 102) Pikul, J., Leszczynski, D. E., & Kummerow, F. A. (1989). Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(5), 1309-1313. <https://doi.org/10.1021/jf00089a022>
- 103) Pluske, J. R., Hampson, D. J., & Williams, I. H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock production science*, 51(1-3), 215-236. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(97\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(97)00057-2)
- 104) Pluske, J.R., Kerton, D.J., Cranwell, P.D., Campbell, R.G., Mullan, B.P., King, R.H., Power, G.N., Pierzynowski, S.G., Westrom, B., Rippe, C., Peulen, O., Dunshea, F.R. (2003).

- Age, sex, and weight at weaning influence organ weight and gastrointestinal development of weanling pigs. Australian Journal of Agricultural Research, 54(5), 515-527. <https://doi.org/10.1071/AR02156>
- 105) Pogorzelska, E., Hamułka, J., Wawrzyniak, A., 2016. Astaksantyna-budowa, właściwości i możliwości zastosowania w żywności funkcjonalnej. Zywnosc. Nauka. Technologia. Jakosc/Food. Science Technology Quality 23. <https://doi.org/10.15193/zntj/2016/104/097>
- 106) Poli, G. (2000). Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. Molecular aspects of medicine, 21(3), 49-98. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00004-2)
- 107) Qin, X., Yang, M., Wang, X., Xiao, H., Cao, C., Chai, J., & Pang, W. (2024). Effects of Astaxanthin on oxidative stress of sows and piglet growth performances. Livestock Science, 105500. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2024.105500>
- 108) Reátegui, J., Barriga, X., Obando, A., Moscoso, G., Manrique, P., Salazar, I., 2020. Hermetia illucens larva (Diptera: Stratiomyidae) meal as a protein ingredient for partial replacement of soybean meal in the feed of Cavia porcellus (Guinea pig): effect on the consumption, weight gain and feed conversion. Scientia Agropecuaria 11. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2020.04.06>
- 109) Ren, P., Wei, B., Qin, W., Tang, Q., Wang, Y., & Xue, C. (2025). Impact of astaxanthin on the capacity of gut microbiota to produce tryptophan catabolites. Food & Function. <https://doi.org/10.1039/D4FO04890C>
- 110) Rozporządzenie Komisji UE nr 2021/1372 od 2021: Dz.U. L 295 z 18.8.2021, p. 1–17. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32021R1372>
- 111) Sánchez-Valle, V., C Chavez-Tapia, N., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2012). Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. Current medicinal chemistry, 19(28), 4850-4860. <https://doi.org/10.2174/092986712803341520>
- 112) Seki, E., & Schnabl, B. (2012). Role of innate immunity and the microbiota in liver fibrosis: crosstalk between the liver and gut. The Journal of physiology, 590(3), 447-458. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.219691>
- 113) Jafari, S. M. S., & Hunger, R. E. (2017). IHC optical density score: a new practical method for quantitative immunohistochemistry image analysis. Applied immunohistochemistry & molecular morphology, 25(1), e12-e13. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000370>
- 114) Shan, T., Yan, J., Zhang, X., & Chen, Y. (2023). In vitro and in vivo evaluation of effects of high-purity magnesium on tight junction of intestinal epithelial cell. Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials, 21, 22808000231165281. <https://doi.org/10.1177/22808000231165281>
- 115) Spranghers, T., Michiels, J., Vrancx, J., Ovyn, A., Eeckhout, M., De Clercq, P., & De Smet, S. (2018). Gut antimicrobial effects and nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) prepupae for weaned piglets. Animal Feed Science and Technology, 235, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.08.012>
- 116) Stanley, C.P., Maghzal, G.J., Ayer, A., Talib, J., Giltrap, A.M., Shengule, S., Wolhuter, K., Wang, Y., Chadha, P., Suarna, C., Prysyazhna, O., Scotcher, J., Dunn, L.L., Prado, F.M., Nguyen, N., Odiba, J.O., Baell, J.B., Stasch, J.-P., Yamamoto, Y., Di Mascio, P., Eaton, P., Payne, R.J., Stocker, R. (2019). Singlet molecular oxygen regulates vascular tone and blood pressure in inflammation. Nature 566, 548–552. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0947-3>
- 117) Sultana, A., Luo, H., & Ramakrishna, S. (2021). Harvesting of antimicrobial peptides from insect (*Hermetia illucens*) and its applications in the food packaging. Applied Sciences, 11(15), 6991. <https://doi.org/10.3390/app11156991>

- 118) Sun, C. Q., O'Connor, C. J., & Roberton, A. M. (2003). Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 36(1-2), 9-17. [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00008-7](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00008-7)
- 119) Suryati, T., Julaha, E., Farabi, K., Ambarsari, H., & Hidayat, A. T. (2023). Lauric acid from the black soldier fly (*Hermetia illucens*) and its potential applications. *Sustainability*, 15(13), 10383. <https://doi.org/10.3390/su151310383>
- 120) Świątkiewicz, M., Witaszek, K., Sosin, E., Pilarski, K., Szymczyk, B., Durczak, K. (2021). The nutritional value and safety of genetically unmodified soybeans and soybean feed products in the nutrition of farm animals. *Agronomy* 11. <https://doi.org/10.3390/agronomy11061105>
- 121) Szczepanik, K., Świątkiewicz, M. (2024). *Hermetia illucens* as a Source of Antimicrobial Peptides – A Review of in vitro and in vivo Studies. *Annals of Animal Science* 24, 77–88. <https://doi.org/10.2478/aoas-2023-0071>
- 122) Tang, Q., Xu, E., Wang, Z., Xiao, M., Cao, S., Hu, S., Wu, Q., Xiong, Y., Jiang, Z., Wang, F., Yang, G., Wang, L., Yi, H. (2022). Dietary *Hermetia illucens* Larvae Meal Improves Growth Performance and Intestinal Barrier Function of Weaned Pigs Under the Environment of Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Frontiers in Nutrition*, 8, 812011. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.812011>
- 123) Vagadia, B. H., Vanga, S. K., & Raghavan, V. (2017). Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor–A review. *Trends in Food Science & Technology*, 64, 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.003>
- 124) Van Moll, L., De Smet, J., Paas, A., Tegtmeier, D., Vilcinskas, A., Cos, P., & Van Campenhout, L. (2022). In vitro evaluation of antimicrobial peptides from the black soldier fly (*Hermetia illucens*) against a selection of human pathogens. *Microbiology Spectrum*, 10(1), e01664-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01664-21>
- 125) Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R., & De, A. (2014). IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PloS one*, 9(5), e96801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096801>
- 126) Vega-Lopez, M. A., Telemo, E., Bailey, M., Stevens, K., & Stokes, C. R. (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 37(1), 49-60. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(93\)90015-V](https://doi.org/10.1016/0165-2427(93)90015-V)
- 127) Vogel, H., Müller, A., Heckel, D. G., Gutzeit, H., & Vilcinskas, A. (2018). Nutritional immunology: diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Developmental & Comparative Immunology*, 78, 141-148. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.008>
- 128) Wang, Min, Wang, Lixia, Tan, X., Wang, Lei, Xiong, X., Wang, Y., Wang, Q., Yang, H., Yin, Y. (2022a). The developmental changes in intestinal epithelial cell proliferation, differentiation, and shedding in weaning piglets. *Animal Nutrition*, 9, 214-222. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.11.006>
- 129) Wang, Meng, Xu, W., Yu, J., Liu, Y., Ma, H., Ji, C., Zhang, C., Xue, J., Li, R., Cui, H. (2022b). Astaxanthin From *Haematococcus pluvialis* Prevents High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Mice by Gut-Liver Axis Modulating Properties. *Frontiers in Nutrition*, 9, 840648. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.840648>
- 130) Wijtten, P. J., van der Meulen, J., & Verstegen, M. W. (2011). Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *British Journal of Nutrition*, 105(7), 967-981. <https://doi.org/10.1017/S0007114510005660>

- 131) Winnicka, A. (2008). Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii (Reference values in basic laboratory analyses in veterinary medicine). Polish. Wydawnictwo Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego Warszawa 2008, 99, 17–39.
- 132) Witaszek, K., Pilarski, K., Niedbała, G., Pilarska, A. A., & Herkowiak, M. (2020). Energy efficiency of comminution and extrusion of maize substrates subjected to methane fermentation. *Energies*, 13(8), 1887. <https://doi.org/10.3390/en13081887>
- 133) Worobec, E. K., Duncan, I. J. H., & Widowski, T. M. (1999). The effects of weaning at 7, 14 and 28 days on piglet behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, 62(2-3), 173-182. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(98\)00225-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00225-1)
- 134) Wu, L., Lyu, Y., Srinivasagan, R., Wu, J., Ojo, B., Tang, M., El-Rassi, G.D., Metzinger, K., Smith, B.J., Lucas, E.A., Clarke, S.L., Chowanadisai, W., Shen, X., He, H., Conway, T., von Lintig, J., Lin, D., 2020. Astaxanthin-Shifted Gut Microbiota Is Associated with Inflammation and Metabolic Homeostasis in Mice. *The Journal of Nutrition*, 150(10), 2687-2698. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa222>
- 135) Wu, Q., Patočka, J., & Kuča, K. (2018). Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins*, 10(11), 461. <https://doi.org/10.3390/toxins10110461>
- 136) Wynn, T. A. (2007). Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(3), 524-529. <https://doi.org/10.1172/JCI31487>
- 137) Xiong, X., Tan, B., Song, M., Ji, P., Kim, K., Yin, Y., & Liu, Y. (2019). Nutritional intervention for the intestinal development and health of weaned pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 6, 46. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00046>
- 138) Xu, Y., Mao, H., Yang, C., Du, H., Wang, H., & Tu, J., 2020. Effects of chitosan nanoparticle supplementation on growth performance, humoral immunity, gut microbiota and immune responses after lipopolysaccharide challenge in weaned pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104, 2, 597-605. <https://doi.org/10.1111/jpn.13283>
- 139) Yamaguchi, K., Hayashi, M., Uchida, Y., Cheng, X. W., Nakayama, T., Matsushita, T., Takeshita, K. (2021). Notch1 haploinsufficiency in mice accelerates adipogenesis. *Scientific reports*, 11(1), 16761. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96017-z>
- 140) Yang, Y., Bae, M., Kim, B., Park, Y. K., Koo, S. I., & Lee, J. Y. (2016). Astaxanthin prevents and reverses the activation of mouse primary hepatic stellate cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 29, 21-26. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.11.005>
- 141) Yilmaz, Y., Tumkaya, L., Mercantepe, T., & Akyildiz, K. (2020). Protective effect of astaxanthin against cisplatin-induced gastrointestinal toxicity in rats. *European Surgery*, 1-7. <https://doi.org/10.1007/s10353-020-00643-2>
- 142) Yin, J., Wu, M. M., Xiao, H., Ren, W. K., Duan, J. L., Yang, G., Li, T. J., & Yin, Y. L. (2014). Development of an antioxidant system after early weaning in piglets. *Journal of animal science*, 92(2), 612-619. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6986>
- 143) Yu, M., Li, Z., Chen, W., Rong, T., Wang, G., Wang, F., & Ma, X. (2020). Evaluation of full-fat *Hermetia illucens* larvae meal as a fishmeal replacement for weanling piglets: Effects on the growth performance, apparent nutrient digestibility, blood parameters and gut morphology. *Animal Feed Science and Technology*, 264, 114431. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114431>
- 144) Zeng, X., Yang, Y., Wang, J., Wang, Z., Li, J., Yin, Y., & Yang, H. (2022). Dietary butyrate, lauric acid and stearic acid improve gut morphology and epithelial cell turnover in weaned piglets. *Animal Nutrition*, 11, 276-282. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.07.012>
- 145) Zhang, J., Liu, Y. J., Tian, L. X., Yang, H. J., Liang, G. Y., Yue, Y. R., & Xu, D. H. (2013). Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in P

- acific white shrimp *L. itopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 19(6), 917-927. <https://doi.org/10.1111/anu.12037>
- 146) Zhang, B., Shang, P., Qiangba, Y., Xu, A., Wang, Z., & Zhang, H. (2016). The association of NR1H3 gene with lipid deposition in the pig. *Lipids in Health and Disease*, 15, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0269-5>
- 147) Zhang, Q.Y., Yan, Z. Bin, Meng, Y.M., Hong, X.Y., Shao, G., Ma, J.J., Cheng, X.R., Liu, J., Kang, J., Fu, C.Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Military Medical Research*, 8, 1-25. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00343-2>
- 148) Zhang, Z., Guo, C., Jiang, H., Han, B., Wang, X., Li, S., Lv, Y., Lv, Z., Zhu, Y. (2020). Inflammation response after the cessation of chronic arsenic exposure and post-treatment of natural astaxanthin in liver: Potential role of cytokine-mediated cell-cell interactions. *Food & Function*, 11(10), 9252-9262. <https://doi.org/10.1039/d0fo01223h>
- 149) Zhu, L. H., Zhao, K. L., Chen, X. L., & Xu, J. X. (2012). Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *Journal of animal science*, 90(8), 2581-2589. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4444>
- 150) Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature reviews Molecular cell biology*, 17(9), 564-580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>

10. Spis tabel, wykresów i rycin

Rycina 1. Metodyka ogólna doświadczenia

Rycina 2. Zdjęcia reprezentatywne preparatów histologicznych z jelit prosiąt. I-VI numery grup doświadczalnych. Powiększenie 4×, pasek skali = 200 µm. Barwienie: Pas-Alcian.

Rycina 3. Obraz mikroskopowy tkanki wątroby: I - grupa kontrolna bez dodatku AST, VI - grupa z dodatkiem AST

Tabela 1. Wpływ udziału mączki z *Hermetia illucens* i astaksantyny w paszy na wybrane wskaźniki hematologiczne krwi prosiąt

Tabela 2. Wpływ udziału mączki z *Hermetia illucens* i astaksantyny w paszy na wybrane wskaźniki biochemiczne krwi prosiąt

Tabela 3. Wpływ udziału mączki z *Hermetia illucens* i astaksantyny w paszy na podstawowe analizy chemiczne mięsa (m. longissimus) oraz stabilność oksydacyjną mięsa i tkanki tłuszczowej

Wykres 1. Wpływ interakcji pomiędzy mączką z larw *Hermetia illucens* (HI) oraz astaksantyną (AST) na wybrane parametry strukturalne ściany dwunastnicy (**P2**)

Wykres 2. Wpływ interakcji pomiędzy mączką z larw *Hermetia illucens* (HI) oraz astaksantyną (AST) na wybrane parametry strukturalne ściany jelita czzego (**P2**)

Wykres 3. Wpływ interakcji pomiędzy mączką z larw *Hermetia illucens* (HI) oraz astaksantyną (AST) na wybrane parametry strukturalne ściany jelita krętego (**P2**)

Wykres 4. Wpływ suplementacji paszy mączką z larw *Hermetia illucens* (HI) oraz astaksantyną (AST) na stopień proliferacji enterocytów w kryptach jelita cienkiego i ekspresję białek połączeń ścisłych (**P2**)

Wykres 5. Wpływ astaksantyny na stężenie enzymów oksydacyjnych. I - grupa kontrolna bez dodatku AST, VI - grupa z dodatkiem AST.

Wykres 6. Średni odsetek włókien kolagenowych w wątrobie w grupie I kontrolnej oraz w grupie VI z dodatkiem AST.

Wykres 7. Geny, których poziomy ekspresji różnią się statystycznie istotnie ($P < 0,05$) między dwiema badanymi grupami: I - grupa kontrolna bez dodatku AST, VI - grupa z dodatkiem AST.

11. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (załącznik nr 1)

12. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej (załącznik nr 2)

Article

Effects of *Hermetia illucens* Larvae Meal and Astaxanthin as Feed Additives on Health and Production Indices in Weaned Pigs

Kinga Szczepanik *, Iwona Furgał-Dierżuk, Łukasz Gala and Małgorzata Świątkiewicz 

Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, Krakowska St. 1, 32-083 Balice, Poland

* Correspondence: kinga.szczepanik@iz.edu.pl

Simple Summary: Weaning is a stressful period that reduces digestive capacity and increases oxidative stress and disease susceptibility in piglets. Feed additives can protect the piglets' health status in a natural way. This study aimed to evaluate the effects of full-fat *H. illucens* larvae meal (HI) and astaxanthin (AST) supplementation on the growth performance and health status of weaned pigs. HI contains bioactive substances (chitin, antimicrobial peptides, lauric acid) with immunostimulatory, antimicrobial, and anti-inflammatory properties. Astaxanthin is a carotenoid pigment with strong antioxidant and anti-inflammatory capacities. The results showed that astaxanthin supports the inhibition of oxidative stress. In the experiment lasting from 35 to 70 days of age, 48 weaned pigs (about 8.7 kg body weight) were involved. Both supplements were tested separately or combined in feed mixtures. The 2.5% HI and AST supplementation can reduce the susceptibility of pork fat to oxidation. However, a higher concentration of HI (5%) was not beneficial because of the adverse changes in some of the red cell indices and thus should be combined with the antioxidant AST to improve these indices. Both supplements did not negatively affect the piglets' productivity.



Citation: Szczepanik, K.; Furgał-Dierżuk, I.; Gala, Ł.; Świątkiewicz, M. Effects of *Hermetia illucens* Larvae Meal and Astaxanthin as Feed Additives on Health and Production Indices in Weaned Pigs. *Animals* **2023**, *13*, 163. <https://doi.org/10.3390/ani13010163>

Academic Editor: Manuel Fondevila

Received: 2 December 2022

Revised: 27 December 2022

Accepted: 29 December 2022

Published: 31 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Weaning is a critical period in farming, and therefore, searching for health-promoting feed additives of natural origin is necessary. This study aimed to evaluate the effects of full-fat *H. illucens* larvae meal (HI) and astaxanthin (AST) supplementation on the growth performance and health status of weaned pigs. The experiment was carried out on 48 pigs (8.7 kg) divided into six groups: I—control; II—2.5% HI; III—5% HI; IV—2.5% HI and AST; V—5% HI and AST; VI—AST. The experiment lasted from the 35th to 70th day of age, and animals were fed ad libitum. The results obtained indicate that HI meal and astaxanthin had no effect on feed intake and utilization, weight gain, or organ weight. Additionally, blood parameters remained within the norms. It seems that astaxanthin supports the inhibition of oxidative stress, which became apparent in the case of some red blood cell parameters. The 2.5% HI and AST supplementation can reduce the susceptibility of pork fat to oxidation (lower adipose tissue TBARS). However, 5% HI in feed was not beneficial because of the adverse changes in some red cell indices, and it should be combined with the antioxidant AST to improve these indices.

Keywords: insect meal; astaxanthin; pigs; growth performance; biochemical blood indices; hematological blood indices

1. Introduction

One of the major problems generating economic losses in pig farming is the weaning period of piglets [1]. There is a very stressful period of the animal's life, involving separation from the sow, environmental and nutritional changes increasing exposure to pathogens and food antigens [2], and a new group hierarchy. Weaning from the sow disrupts the intestinal integrity of piglets, reduces the digestive capacity of the digestive system, and increases

intestinal oxidative stress and disease susceptibility in piglets [3]. One of the key factors affecting piglet health is diet, and an important component of diet is an easily digestible protein with a favorable amino acid composition. Currently, the main protein sources for monogastric animals are post-extraction meals and oil-pressed cakes (e.g., soybean, rapeseed), legumes seeds, animal origin proteins, or algal biomass [4–6]. The rapidly growing human population and the increasing demand for meat and products of animal origin have increased the need for protein feed quantities. The search for new protein sources has become necessary because of the scarcity of plant-based feed protein sources due to unfavorable climate changes and the aversion to genetically modified feedstuffs, so the search for new protein sources has become necessary [6].

Attention has begun to turn to insect meal, which could provide an additional source of nutritional components [7–9]. The innovative protein products obtained from various insect species have already started to be used for salmonid feeds [10,11] as well as pet food [12]. As a result, interest in black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae (HI) as a sustainable protein source for livestock has increased significantly. Insects' production advantage is that they can be reared at high densities and have a high bioconversion rate [9]. Organic biomass, byproducts, or food waste can be used for their production, which contributes to more efficient management of organic and inorganic nutrient resources, particularly nitrogen and phosphorus recycling [8,13]. There are currently two types of *H. illucens* larvae meal in feedstuffs: defatted and full fat, in which the main difference is the fat and saturated fatty acid content [6]; in the present experiment, a full-fat meal from *H. illucens* larvae was used. The amount of crude protein in the full-fat HI meal was 426 g/kg, crude fat content was 264 g/kg, crude fiber content was 91 g/kg, and ash content was 85 g/kg. Noteworthy is the amino acid composition of black soldier fly larvae meal. The most abundant essential amino acids were leucine (26.2 g/kg), lysine (21.6 g/kg), and phenylalanine + tyrosine (36.2 g/kg). Promising in terms of improving the health status of animals is the presence in insects of bioactive substances such as chitin, antimicrobial peptides, and specific fatty acids (notably lauric acid) with immunostimulatory, antimicrobial, and anti-inflammatory properties [14,15]. These bioactive compounds appear to be useful feed additives to support the growth and health of piglets by stimulating their immune response, which is important when conducting intensive livestock production and limiting therapy, especially with antibiotics.

The young piglet's body develops rapidly, which is associated with an accelerated metabolism. This and weaning stress affect the production of significant amounts of free radicals [16]. Reactive oxygen species from the mitochondrial electron transport chain or excessive stimulation of NAD(P)H cause oxidative stress can be important mediators of damage to cellular structures, including lipids and membranes, proteins, and DNA [17]. Therefore, adding antioxidants to the diet seems beneficial, which can help counteract the negative effects of oxidative stress [18]. As an antioxidant in the present experiment, astaxanthin was used, which is one of the carotenoid pigments with strong antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties [19]. The antioxidant properties of astaxanthin are 14 times greater than those of vitamin E, 54 times greater than those of β-carotene, and 65 times greater than those of vitamin C [20]. In addition, astaxanthin is believed to protect against apoptosis by regulating mitochondrial proteins [21]. A study by Macedo et al. (2010) [22] found that astaxanthin, by reducing the level of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated neutrophils, improves the phagocytic capacity of neutrophils and their bactericidal capacity, and reduces the amount of hydrogen peroxide and superoxide anion they produce.

Given the above, this experiment aimed to study the effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin as feed additives, with the potential to improve the health status and production indicators of weaned pigs. The blood health indices (biochemical and hematological), growth performance, and meat quality traits were estimated.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval

All procedures included in this study relating to the use of live animals agreed with the First Local Ethics Committee for Experiments with Animals in Cracow, Poland (Resolution No. 420/2020, date 22 July 2020). Throughout the experimental period, the health status of postweaning pigs was regularly monitored by a veterinarian.

2.2. Animals and the Layout of the Experiment

The experiment was conducted on forty-eight 35-day-old post-weaning pigs (barrows) weighing about 8.7 kg (± 0.2 kg). The barrows were of the Polish Landrace (PL) breed. The pigs were divided into six groups, with eight pigs in each: group I—control, group II—addition of 2.5% *Hermetia illucens* (HI) larvae meal, group III—addition of 5% *H. illucens* larvae meal, group IV—addition of 2.5% *H. illucens* larvae meal and astaxanthin, group V—addition of 5% *H. illucens* larvae meal and astaxanthin, group VI—addition of astaxanthin. The *Hermetia illucens* larvae meal was a full-fat product obtained from commercial sources (HiProMine S.A., Robakowo, Poland). The astaxanthin originated from *Haematococcus pluvialis* (Podkowa AD 1905 sp. z o.o., Lublin, Poland) and was added in the amount of 0.025 g per 1 kg (25 mg per kg) of feed mixture. All piglets were fed an iso-protein and iso-energetic diet, meeting the requirements according to the Polish standards of pig feeding [23]. The ingredient composition and nutritive value of the diets are shown in Table 1. Basic chemical analyses of feed mixture samples were performed according to standard methods [24].

Table 1. Ingredients (%) and nutritive value of diets in the experiment.

Items	I Control	II HI 2.5%	III HI 5%	IV HI 2.5% + AST	V HI 5% + AST	VI AST
Soybean pressed cake	19	16	13	16	13	19
<i>Hermetia illucens</i> larvae meal	-	2.5	5	2.5	5	-
Wheat	42.2	43.6	44.2	43.6	44.2	42.2
Corn	20	20	20	20	20	20
Rapeseed oil	0.8	-	-	-	-	0.8
Skimmed milk powder	10	10	10	10	10	10
Dried whey	5	5	5	5	5	5
1-Ca phosphate	0.4	0.3	0.3	0.3	0.3	0.4
Feed chalk	1.2	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2
Salt	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Lysine	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Methionine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Threonine	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Tryptophan	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Vitamin–mineral premix *	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Astaxanthin (0.025 g/kg)	-	-	-	+	+	+
Content in 1 kg:						
Dry matter, g	901	899	898	899	898	901
Crude protein, g	183	183	183	183	183	183
Crude fat, g	40	36	40	36	40	40
Crude fiber, g	27	28	29	28	29	27
Crude ash, g	56	55	54	55	54	56
Metabolizable energy, MJ **	13.8	13.7	13.7	13.7	13.7	13.8
Lysine, g	13.7	13.7	13.6	13.7	13.6	13.7
Methionine + Cystine, g	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2

Table 1. Cont.

Items	I Control	II HI 2.5%	III HI 5%	IV HI 2.5% + AST	V HI 5% + AST	VI AST
Threonine, g	8.8	8.8	8.7	8.8	8.7	8.8
Tryptophan, g	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7	2.7
Calcium, g	7.6	7.7	7.6	7.7	7.6	7.6
Phosphorus digestible, g	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1

Abbreviations: HI—*Hermetia illucens* larvae meal; AST—astaxanthin. I, II, III, IV, V, VI—number of groups: group I—control, group II—addition of 2.5% *Hermetia illucens* (HI) larvae meal, group III—addition of 5% *H. illucens* larvae meal, group IV—addition of 2.5% *H. illucens* larvae meal and astaxanthin, group V—addition of 5% *H. illucens* larvae meal and astaxanthin, group VI—addition of astaxanthin. * Content in 1 kg of premix: vit A—2,400,000 IU; vit D3—400,000 IU; vit E—8000 IU; vit B1—400 mg; vit B12—6000 µg; vit B2—1000 mg; vit B5—3000 mg; vit B6—600 mg; vit K—400 mg; biotin—30,000 µg; niacin—5008.3 mg; folic acid—100 mg; pantothenic acid—2760 mg; choline—24,193.548 mg; betaine—12,000 mg; Cu—20,000 mg; Fe—20,000 mg; I—200 mg; Mn—8000 mg; Se—60 mg; Zn—24,000 mg; Ca—267.979 g; Cl—6.268 g; K—0.066 g; Mg—30 g; Na—0.037 g; S—22.245 g. ** Metabolizable energy was calculated using Hoffmann and Schiemann's equation (1980) [25].

The experimental fattening lasted 35 days. The pigs were kept in individual pens and received feed and water ad libitum. The animals were individually weighed on the experiment's first and last day. Daily feed intake and conversion, as well as animal weight gain, were calculated. At the end of the experiment, all pigs were slaughtered. The animals were killed with an approved standard method by simply stunning with a specialized penetrating pin device Blitz (Germany), along with cartridges caliber 9 × 17 mm dedicated to slaughtering pigs. Blood was collected in tubes for biochemical and hematological analysis. Intestine sections, kidneys, stomach, liver, and spleen were collected for weighing. Samples of muscle (*longissimus m.*) and adipose (backfat) tissue were also taken from the area between the last thoracic and first lumbar vertebrae. The dissected intestine sections (duodenum, jejunum, ileum, cecum, and large intestine) were rinsed, weighed, and measured. The pH of the stomach, duodenum, jejunum, ileum, large intestine, and caecum digesta was measured with a HI 99163 pH-meter (Hanna Instruments Inc., Woonsocket, RI, USA), with automatic temperature compensation from −5 to 105 °C and equipped with a pH/T° FC 232 combination electrode.

2.3. Blood Analysis

2.3.1. Hematological Parameters

The full blood samples were analyzed using the Vet Mythic 18 automatic hematology analyzer (Orphée C2 Diagnostics, France). The parameters evaluated were total white blood cell (WBC) count, lymphocytes (LYM), monocytes (MON), granulocytes (GRA), red blood cells (RBC) count, hemoglobin content (HGB), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), red cell distribution width (RDWC), number of platelets (PLT) and their mean volume (MVP), platelet size heterogeneity index (PDW), and plateletrit (PCT).

2.3.2. Biochemical Parameters

Blood samples for the biochemical parameters were collected in test tubes and centrifuged (3500×g, 15 min, 4 °C) to obtain serum samples. The biochemical indices were colorimetrically measured using test Cormay kits (Lublin, Poland) and a BS-180 biochemical automatic analyzer (Shenzhen Mindray Bio-medical Electronics Co. Ltd., Shenzhen, China). The following parameters were determined: total cholesterol (CHOL), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), triacylglycerides (TG), lactate dehydrogenase (LDH), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), glucose (GLU), albumin (ALB), creatinine (CREA), urea (UREA), total protein (TP), calcium (Ca), phosphate (P), magnesium (Mg), iron (Fe).

2.4. Meat and Backfat Sample Collection and Analysis

Samples of meat (*longissimus m.*) and adipose tissue (backfat) were taken from the area between the last thoracic and the first lumbar vertebrae. Basic chemical analyses (dry matter, crude protein, crude fat, and crude ash) of meat samples were performed according to standard methods [24]. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were analyzed in meat and backfat samples after 3 months of storage at -20°C , using a modified method proposed by Pikul et al. (1989) [26]. In brief, 10 g of shredded sample was homogenized with 50 mL of 4% perchloric acid with butylated hydroxytoluene. After filtration, 5 mL of the filtrate was mixed with 5 mL of 2-thiobarbituric acid (0.02 M). The solution was heated in a test tube for 1 h, in a boiling water bath, and then cooled under running water for 10 min. The measurement was carried out at 532 nm against a calibration curve containing a blank sample.

2.5. Statistical Analysis

Data were analyzed by 2-way ANOVA using Statistica® ver. 13.3 software packages (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) [27]. The model included two main factors: (1) *Hermetia illucens* larvae meal share (2.5% vs. 5.0%) and (2) the astaxanthin presence in the feed mixture, and their interactions. Each individual piglet served as an experimental unit ($n = 8$, per group). Before the data analysis, the normality of the data was tested using the Shapiro–Wilk test and histograms were evaluated. Duncan's test was used to compare differences between averages when the difference was found to be significant ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Growth Performance

All animals were healthy during the experiment and showed no signs of disease. Indicators of weight gain, feed conversion ratio, average daily gain, feed intake, and parameters collected during dissection are shown in Tables 2 and 3. There were no statistically significant differences between the groups.

Table 2. Effect of *Hermetia illucens* meal share and astaxanthin presence in feed on the productivity performance of piglets.

Items	<i>Hermetia illucens</i> Share (HI)			Astaxanthin Share (AST)		I	II	III	IV	V	VI	<i>p</i> -Level		SEM	
	0	2.5	5	-	+							AST	HI	AST	
Average body weight, kg															
1st day of experiment	8.74	8.64	8.75	8.70	8.72	8.89	8.58	8.64	8.70	8.85	8.60	0.886	0.941	0.578	0.10
35th day of experiment	34.19	34.46	34.19	34.28	34.29	34.36	34.43	34.05	34.49	34.32	34.05	0.883	0.988	0.897	0.24
Average daily weight gains, g															
1–35 day of experiment	727	738	727	731	730	728	738	726	737	728	727	0.692	0.985	0.992	5.63
Average daily feed intake, kg															
1–35 day of experiment	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08	1.08	1.09	1.08	1.08	1.08	1.08	0.959	0.991	0.781	0.01
Feed conversion ratio, kg															
1–35 day of experiment	1.49	1.47	1.50	1.48	1.48	1.49	1.46	1.50	1.47	1.49	1.49	0.191	0.876	0.853	0.01

I, II, III, IV, V, VI—number of groups; *Hermetia illucens* share of 0% (groups I and VI), *Hermetia illucens* share of 2.5% (group II and group IV), *Hermetia illucens* share of 5% (group III and group V) and astaxanthin supplementation (groups IV, V, and VI), without astaxanthin supplementation (groups I, II, and III).

Table 3. Effect of *Hermetia illucens* meal share and astaxanthin presence in feed on the weight of organs and digestive tract sections of piglets.

Items	Hermetia illucens Share (HI)			Astaxanthin Share (AST)		I	II	III	IV	V	VI	p-Level			
	0	2.5	5	-	+	Control	HI 2.5%	HI 5%	HI 2.5% + AST	HI 5% + AST	AST	HI	AST	HI × AST	SEM
Liver	2.63	2.63	2.62	2.61	2.64	2.63	2.60	2.61	2.65	2.62	2.64	0.96	0.665	0.953	0.03
Spleen	0.21	0.20	0.20	0.21	0.21	0.21	0.21	0.20	0.20	0.20	0.21	0.522	0.917	0.972	0.003
Kidney	0.27	0.28	0.27	0.28	0.27	0.28	0.28	0.27	0.27	0.28	0.27	0.977	0.687	0.797	0.004
Stomach	0.74	0.75	0.74	0.75	0.74	0.74	0.75	0.74	0.75	0.73	0.73	0.908	0.596	0.963	0.01
Duodenum	0.08	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.07	0.08	0.08	0.262	0.513	0.34	0.002
Caecum	0.28	0.27	0.28	0.27	0.27	0.28	0.28	0.27	0.27	0.28	0.28	0.965	0.886	0.742	0.003
Small intestine	3.37	3.37	3.35	3.35	3.37	3.35	3.38	3.33	3.35	3.36	3.39	0.967	0.862	0.907	0.04
Large intestine	1.67	1.69	1.66	1.67	1.68	1.68	1.69	1.65	1.70	1.66	1.67	0.746	0.901	0.987	0.02

I, II, III, IV, V, VI—number of groups; *Hermetia illucens* share of 0% (groups I and VI), *Hermetia illucens* share of 2.5% (group II and group IV), *Hermetia illucens* share of 5% (group III and group V) and astaxanthin supplementation (groups IV, V, and VI), without astaxanthin supplementation (groups I, II, and III).

3.2. Blood Indices

The effects of insect meal from *Hermetia illucens* larvae administered at different doses and astaxanthin on the biochemical blood indices, as well as the interaction between these factors, are shown in Table 4. Lipid profile was not affected by the HI meal, except HDL ($p = 0.03$) and LDH content ($p < 0.01$), and not by the astaxanthin supplementation in feed. Analyzing the hepatic/pancreas and the renal and osteological profiles, some varied effects of experimental nutritional factors were observed. HI meal lowered the GLU content ($p < 0.05$) when added at 5% in the feed, while the astaxanthin supplementation increased the GLU and ALP contents. However, in the case of ALP as well as ALB content, the interaction was statistically significant: these parameters were higher when astaxanthin was added to the feed mixture together with the HI meal. The 2.5% HI meal supplementation in feed increased the p -level ($p < 0.01$) and decreased the CREA level ($p = 0.02$) in piglets' blood, while 5% HI meal supplementation lowered the Ca level ($p < 0.01$). The Mg content in the blood was not affected by the HI meal addition in feed. The astaxanthin increased CREA, Ca, and Mg levels ($p < 0.01$). The interaction ($p < 0.01$) between both nutritional factors was noticed in the TP amount in the blood, which was the lowest in piglets receiving a feed mixture containing HI meal without astaxanthin.

The results of the hematological analysis of piglet blood are shown in Table 5. Astaxanthin supplementation did not affect white blood cell counts, while the 5% HI meal increased LYM counts ($p = 0.04$). Significant interactions indicate that MON and GRA were affected only when both dietary factors were used together, and the highest amount of MON and GRA was observed in piglets fed a mixture containing 5% HI meal along with AST ($p = 0.01$ and 0.02, respectively). Both HI meal and AST affected red blood cell parameters ($p < 0.05$), but the interaction was significant for HCT and MCV only. The lowest values of these parameters were read for the groups fed 5% HI meal supplementation ($p < 0.01$; $p = 0.02$). Analyzing the main factors, a significant increase in the level of RDWC after the addition of AST and 5% HI was noticeable ($p < 0.01$). The number of RBCs increased after the addition of AST ($p < 0.01$) but was not affected by HI meal in the diet. The Fe level was lower in the blood of piglets fed with HI meal ($p = 0.01$) but was about 30% higher after the addition of astaxanthin ($p < 0.01$). HGB level decreased after supplementation with AST ($p < 0.01$) and 5% HI meal ($p = 0.02$) meal. Both AST and 5% HI meal decreased MCH ($p < 0.01$). In the case of platelet parameters, the only effect was observed in PDW when 2.5% HI meal was used in the feed mixture, which significantly reduced this value ($p < 0.01$).

Table 4. Effect of *Hermetia illucens* meal share and astaxanthin presence in feed on the biochemical indices of piglets' blood.

Items	Hermetia illucens Share (HI)			Astaxanthin Share (AST)		Control	I	II	III	IV	V	VI	p-Level	
	0	2.5	5	-	+								HI × AST	SEM
Lipid profile														
CHOL, mg/dL	97.4	100.4	93.7	96.0	98.4	95.7	102.8	89.8	98.1	97.6	99.4	0.415	0.573	0.458
TG, mg/dL	41.0	46.2	36.8	42.5	40.1	43.1	46.4	38.0	46.0	35.6	38.6	0.063	0.445	0.870
HDL, mg/dL	40.5 ^{a,b}	44.7 ^a	38.7 ^b	40.3	42.2	38.8	44.7	37.6	44.6	39.8	42.3	0.031	0.321	0.716
LDL, mg/dL	51.3	49.4	49.1	50.4	49.5	51.7	51.8	47.6	46.9	50.6	50.8	0.767	0.736	0.487
LDH, U/L	1324.7 ^a	1482.1 ^a	1706.8 ^b	1528	1472.5	1300.7	1556.6	1755.1	1407.5	1658.4	1351.7	<0.01	0.426	0.576
Hepatic and pancreas profile														
ALT, U/L	46.4	48.7	46.6	48.0	46.5	46.7	51.4	46.0	46.0	47.3	46.2	0.756	0.570	0.590
AST, U/L	50.3	57.1	54.9	55.9	52.2	50.4	58.6	59.3	55.6	50.6	50.2	0.483	0.406	0.758
ALP, U/L	237.5	255.4	261.4	234.8 ^a	268.2 ^b	263.4 ^{ab}	217.5 ^a	220.0 ^a	293.4 ^b	302.8 ^b	208.4 ^a	0.374	0.031	<0.01
GLU, mg/dL	135.6 ^a	136.4 ^a	120.9 ^b	121.2 ^a	141.3 ^b	131.8	124.1	106.3	148.6	135.5	139.9	0.046	<0.01	0.269
ALB, g/dL	4.2	3.9	3.9	3.9	4.1	4.34 ^d	3.8 ^{ab}	3.7 ^a	4.1 ^{bcd}	4.2 ^{cd}	4.0 ^{abc}	0.058	0.115	<0.01
Renal profile														
CREA, mg/dL	1.0 ^a	0.9 ^b	1.0 ^{ab}	0.9 ^a	1.0 ^b	1.0	0.8	0.9	1.0	1.1	1.0	0.022	<0.01	0.177
UREA, mg/dL	23.8	21.3	22.4	22.2	22.8	25.8	20.3	20.2	22.3	24.5	21.6	0.591	0.712	0.187
TP, g/dL	6.3	6.2	6.0	6.1	6.3	6.4 ^b	6.1 ^b	5.6 ^a	6.3 ^b	6.4 ^b	6.2 ^b	0.174	0.051	<0.01
Ca, mg/dL	12.2 ^a	12.7 ^a	10.9 ^b	11.5 ^a	12.4 ^b	11.8	12.6	10.0	12.9	11.8	12.6	<0.01	<0.01	0.085
P, mg/dL	10.3 ^a	11.4 ^b	9.6	10.6	10.3	10.5	11.3	10.0	11.4	9.2	10.1	<0.01	0.322	0.581
Mg, mg/dL	2.2	2.3	2.2	2.1 ^a	2.4 ^b	2.1	2.3	2.0	2.4	2.3	2.3	0.162	<0.01	0.603
Osteological profile														
Ca, mg/dL	12.2 ^a	12.7 ^a	10.9 ^b	11.5 ^a	12.4 ^b	11.8	12.6	10.0	12.9	11.8	12.6	<0.01	<0.01	0.085
P, mg/dL	10.3 ^a	11.4 ^b	9.6 ^a	10.6	10.3	10.5	11.3	10.0	11.4	9.2	10.1	<0.01	0.322	0.581
ALP, U/L	237.5	255.4	261.4	234.8 ^a	268.2 ^b	263.4 ^{ab}	217.5 ^a	220.0 ^a	293.4 ^b	302.8 ^b	208.4 ^a	0.374	0.031	<0.01
ALB, g/dL	4.2	3.9	3.9	3.9	4.1	4.3 ^d	3.8 ^{ab}	3.6 ^a	4.1 ^{bcd}	4.2 ^{cd}	3.9 ^{abc}	0.058	0.115	<0.01

I, II, III, IV, V, VI—number of groups; *Hermetia illucens* share of 0% (groups I and VI), *Hermetia illucens* share of 2.5% (group II and group IV), *Hermetia illucens* share of 5% (group III and group V) and astaxanthin supplementation (groups IV, V, and VI), without astaxanthin supplementation (groups I, II, and III). ^{a,b,c,d}—values within a row with different superscripts differ significantly at $p \leq 0.05$. Abbreviations: CHOL—total cholesterol, HDL—high-density lipoprotein, LDL—low-density lipoprotein, TG—triacylglycerides, LDH—lactate dehydrogenase, ALT—alanine aminotransferase, AST—aspartate aminotransferase, ALP—alkaline phosphatase, GLU—glucose, ALB—albumin, CREA—creatinine, UREA—urea, TP—total protein, Ca—calcium, P—phosphate, Mg—magnesium.

Table 5. Effect of *Hermetia illucens* meal share and astaxanthin presence in feed on the hematological indices of piglets' blood.

Items	Hermetia illucens Share (HI)			Astaxanthin Share (AST)		I	II	III	IV	V	VI	<i>p</i> -Level			
	0	2.5	5	-	+	Control	HI 2.5%	HI 5%	HI 2.5% + AST	HI 5% + AST	AST	HI	AST	HI × AST	SEM
WBC, 10 ³ /μL	9.5	11.4	12.0	10.4	12.2	9.9	10.6	10.6	12.3	14.8	8.5	0.093	0.201	0.203	0.57
LYM, 10 ³ /μL	4.5 ^a	6.3 ^{ab}	7.0 ^b	5.3	7.2	4.4	5.1	6.3	7.6	8.4	4.6	0.043	0.058	0.508	0.43
MON, 10 ³ /μL	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4 ^{ab}	0.5 ^{ab}	0.4 ^a	0.3 ^a	0.6 ^b	0.5 ^{ab}	0.444	0.308	0.012	0.02
GRA, 10 ³ /μL	4.6	4.7	4.5	4.6	4.6	5.1 ^{ab}	5.0 ^{ab}	3.9 ^{ab}	4.4 ^{ab}	5.8 ^b	3.4 ^a	0.657	0.733	0.022	0.24
RBC, 10 ⁶ /μL	6.2	6.5	6.1	5.7 ^a	6.9 ^b	5.7	6.1	5.4	6.9	6.9	6.8	0.210	<0.01	0.218	0.12
HGB, g/dL	12.9 ^a	12.7 ^a	11.7 ^b	13.0 ^a	11.8 ^b	13.9	13.4	11.8	12.0	11.7	11.8	0.024	<0.01	0.081	0.20
Fe, μg/dL	140.3 ^a	116.4 ^b	107.0 ^b	106.1 ^a	137.8 ^b	125.8	104.1	86.0	128.8	128.0	156.6	0.011	<0.01	0.743	5.37
HCT %	39.8 ^a	41.0 ^a	35.6 ^b	35.5 ^a	42.3 ^b	37.7 ^b	38.3 ^{bc}	30.3 ^a	43.7 ^d	41.0 ^{cd}	42.2 ^d	<0.01	<0.01	<0.01	0.74
RDWC %	18.8 ^a	18.0 ^a	20.0 ^b	18.5 ^a	19.4 ^b	18.5	17.2	19.8	18.7	20.2	19.2	<0.01	0.032	0.518	0.23
MCV, μm ³	64.0 ^a	63.4 ^a	58.4 ^b	62.2	61.7	65.7 ^d	63.2 ^{cd}	57.1 ^a	63.5 ^{cd}	59.6 ^{ab}	62.1 ^{bc}	<0.01	0.724	0.025	0.59
MCH, pg	21.3 ^a	19.8 ^b	19.6 ^b	22.9 ^a	17.5 ^b	24.2	22.1	22.3	17.5	17.0	18.0	<0.01	<0.01	0.120	0.43
PLT, 10 ³ /μL	220.4	272.6	235.8	241.8	243.2	211.4	277.4	240.3	267.8	231.3	230.5	0.068	0.993	0.760	9.19
PDW %	39.9 ^a	31.9 ^b	43.6 ^a	36.9	40.2	37.3	31.2	42.0	32.5	45.2	42.9	<0.01	0.079	0.652	1.16
PCT %	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.127	0.967	0.605	0.01
MPV, μm ³	8.3	8.4	8.8	8.3	8.7	8.1	8.2	8.7	8.7	8.9	8.4	0.055	0.076	0.838	0.09

I, II, III, IV, V, VI—number of groups; *Hermetia illucens* share of 0% (groups I and VI), *Hermetia illucens* share of 2.5% (group II and group IV), *Hermetia illucens* share of 5% (group III and group V) and astaxanthin supplementation (groups IV, V and VI), without astaxanthin supplementation (groups I, II and III). ^{a,b,c,d}—values within a row with different superscripts differ significantly at $p \leq 0.05$. Abbreviations: WBC—white blood cells; LYM—lymphocytes; MON—monocytes; GRA—granulocytes; RBC—red blood cells; HGB—hemoglobin; Fe—iron; HCT—hematocrit; RDWC—red blood cell distribution width; MCV—mean corpuscular volume; MCH—mean corpuscular hemoglobin; PLT—platelets; PDW—platelet distribution width; PCT—plateletcrit; MPV—mean platelet volume.

3.3. Meat and Backfat Analysis

The effects of astaxanthin and *H. illucens* larvae meal on the basic chemical analysis of meat are shown in Table 6. The highest dry matter of meat was determined in piglets treated with 2.5% HI meal or 2.5% HI meal together with AST (interaction $p = 0.02$). The lowest percentage of ash in meat (calculated in dry matter) was determined in the group treated with 2.5% HI meal ($p < 0.01$) and in groups not treated with AST ($p = 0.03$). The protein and fat content in meat (calculated in dry matter) were not affected by HI meal nor AST supplementation in feed.

Table 6. Effect of *Hermetia illucens* meal share and astaxanthin presence in feed on the basic chemical analyses of meat (*longissimus m.*) and the oxidative stability of meat and backfat tissue.

Items	Hermetia illucens Share (HI)			Astaxanthin Share (AST)		I	II	III	IV	V	VI	<i>p</i> -Level			SEM
	0	2.5	5	-	+							AST	HI	AST	HI × AST
Nutrient content in meat															
Dry matter (DM), %	23.5 ^a	24.1 ^b	23.6 ^a	23.8	23.7	23.2 ^a	24.2 ^c	23.9 ^{bc}	23.9 ^{bc}	23.4 ^{ab}	23.8 ^{bc}	0.007	0.706	0.016	0.086
Protein, % in DM	87.8	80.4	86.2	82.9	86.9	88.3	74.4	85.2	86.3	87.2	87.1	0.074	0.123	0.132	1.445
Fat, % in DM	7.7	7.5	7.3	7.9	7.1	8.4	7.6	7.5	7.4	7.2	6.8	0.871	0.112	0.348	0.214
Ash, % in DM	5.2 ^a	4.3 ^b	5.0 ^a	4.7 ^a	5.0 ^b	5.1	4.1	4.9	4.6	5.1	5.3	<0.010	0.030	0.633	0.009
TBARS content in tissues (mg/kg)															
Meat (<i>longissimus m.</i>)	0.3	0.3	0.3	0.3 ^a	0.3 ^b	0.3	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.160	0.002	0.144	0.010
Adipose tissue (backfat)	0.8 ^a	0.3 ^b	0.4 ^b	0.7 ^a	0.3 ^b	1.3 ^a	0.3 ^b	0.4 ^b	0.3 ^b	0.4 ^b	0.3 ^b	<0.010	<0.010	<0.010	0.068

I, II, III, IV, V, VI—number of groups; *Hermetia illucens* share of 0% (groups I and VI), *Hermetia illucens* share of 2.5% (group II and group IV), *Hermetia illucens* share of 5% (group III and group V) and astaxanthin supplementation (groups IV, V, and VI), without astaxanthin supplementation (groups I, II, and III). ^{a,b,c}—values within a row with different superscripts differ significantly at $p \leq 0.05$.

The results of measurements of oxidative stability of meat and adipose tissue from pigs fed with a mixture containing *Hermetia illucens* meal or astaxanthin are presented in Table 6. Both HI meal and AST significantly decreased the TBARS in adipose tissue (backfat) after 3 months of frozen storage ($p < 0.01$), and the interaction between these factors resulted $p < 0.01$. In comparison to the control group, the 2.5% HI concentration was more effective than the 5% HI concentration (TBARS decreased by 80% vs. 69%), and the AST was more effective alone or together with 2.5% HI added to the feed mixture (TBARS decreased by about 77%). However, in the case of meat, the HI meal supplementation did not influence the TBARS value, while the AST supplementation increased this parameter ($p < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Growth Performance

The inclusion of *H. illucens* larvae meal in the diet did not adversely affect the growth performance of the piglets involved in this study, and no effect of HI meal was observed on the weight of organs and digestive tract sections of piglets (calculated as % of body weight). In contrast, in the experiment of Yu et al. (2020) [28], piglets fed with a mixture containing 0%, 1%, 2%, or 4% of HI meal showed a linear increase in the pancreas and small intestine in response to this diet supplementation. No negative effects on feed intake, feed conversion ratio, or average daily gain were observed. The fact that the presence of HI meal in the feed did not impair the feed intake of the piglets is a favorable result and confirms that insect-originated feed is palatable to these animals. The interest of piglets and their willingness to eat black fly larvae have also been observed by other authors [29]. Conclusions similar to ours were reached by Biasato et al. (2019) [30], who carried out an experiment on weaned piglets fed defatted *H. illucens* larvae meal. The HI larvae meal was included in increasing amounts (0%, 5%, or 10%) in diets formulated for two feeding

phases: I (from day 1 to 23) and II (from day 24 to 61). No significant differences in growth performance were observed, except for average daily feed intake in phase II, which showed a linear response to increasing levels of HI meal. Additionally, no effect was observed on the growth performance of weaned piglets fed diets containing up to 8% full-fat HI meal for 15 days [31]. No differences in piglets' performance were found also by Driemeyer (2016) [32] when fish meal was partially replaced by HI meal. The researcher fed piglets (10 to 28 days of age) on a four-week phase feeding schedule with a diet containing 3.5% HI meal. There were no significant differences obtained for feed intake and average daily gains of the animals. In contrast, in the study by Chia et al. (2021) [33], an effect of *H. illucens* meal on increased daily weight gain was observed. Carcass weights of pigs fed diets with HI meal as a replacement for a fish meal at 50%, 75%, or 100% (*w/w*) were higher than those of pigs fed a control diet. In the groups receiving 50% and 100% insect meal in place of fish meal, final body weight was significantly higher than in the control and 25% insect meal-treated groups. In our experiment, no significant differences in final body weight were observed among groups, and no significant differences in feed conversion ratio (FCR) were shown. In contrast, in the experiment with 50%, 75%, or 100% insect meal, FCR was significantly lower than in the control and 25% insect meal groups [33]. In another study [28], crossbred pigs weighing approximately 76.0 kg were assigned to three groups in which they received increasing levels of *H. illucens* meal (0%, 4%, or 8%). The results showed that the 4% HI diet significantly increased the final body weight and average daily weight gain of the pigs and decreased the feed to gain ratio compared to the 0% and 8% HI diets. There were no differences in average daily feed intake among all three groups. One study [34] was conducted for 40 days to investigate the effect of increasing levels of HI larvae oil supplementation on the growth performance of newly weaned pigs (at 21 days of age) reared in a three-phase feeding program. It was found that supplementation with 0%, 2%, 4%, or 6% of insect oil linearly increased ($p < 0.05$) body weight on days 14, 21, 25, 33, and 40, but did not affect the feed intake throughout the whole experiment. However, daily weight gains and feed conversion ratios were linearly improved only in the first rearing period from 0 to 14 days of the experiment. When the weaned piglets received a feed mixture containing 5%, 10%, or 20% of HI meal [35], no significant linear effect was observed in weight gain and feed efficiency. Looking at the nutritional factor, which was an insect product from *Hermetia illucens*, it is conceivable that the variety of results observed in the studies cited above may be due to both the type of product (meal, oil) and the period in which the pigs were included in the experiment. This statement is consistent with the observation of a linear improvement in both ADG and FCR when the supplement of HI meal in feed increased from 0%, 1%, 2%, to 4% in the two first weeks post-weaning, whereas no differences were found for a four-week feeding period [36].

The significant effect of astaxanthin supplementation in the amount of 25 mg per 1 kg of feed on the growth performance of weaned piglets was not observed in the present experiment. Similarly [37], the addition of astaxanthin to the pigs' diet (1.5 or 3 mg per kg of feed) did not affect the average daily gain, average daily feed intake, or feed conversion ratio. When analyzing the nutritional factor astaxanthin, it is important to keep in mind the small number of papers describing the effect of AST supplementation on production performance in pigs. Therefore, the discussion must be expanded to include other monogastric species. Ao and Kim (2019) [38] experimented on Peking ducks that were fed astaxanthin originating from *Phaffia rhodozyma*. A total of 1440 female 1-day-old Peking ducks (approximately 52 g) were divided into three groups: control group—0 mg AST/kg diet, group I—3458 mg AST/kg diet, and group II—6915 mg AST/kg diet. It was found that on days 22 to 42, the inclusion of AST increased weight gain and decreased the feed to gain ratio. Throughout the experiment, weight gain and final body weight were greater in the AST treatment compared to the control group. AST supplementation in the amount of 25 mg per 1 kg of feed, as in the present experiment, did not affect organ weights. In an experiment by Jeong and Kim (2014) [39], 1-day-old male chicken broilers were used to test the effect of AST originated from *P. rhodozyma* on animal rearing rates.

The birds received a supplement of 0, 2.3, or 4.6 mg AST/kg feed. The inclusion of AST improved weight gain at finishing and throughout the experimental period and reduced the feed conversion ratio at finishing. Thus, it was suggested that AST supplementation may improve weight gain and reduce the feed conversion ratio. Lei and Kim (2014) [40] evaluated the effects of AST derived from *Phaffia rhodozyma* on the performance and nutrient digestibility of finishing pigs. For this purpose, crossbred pigs (initial body weight of about 58 kg) were treated with 0%, 0.1%, or 0.2% supplementation of *P. rhodozyma*, in which AST content was 2.305 mg/kg after fermentation and freeze-drying. The results showed that the addition of *P. rhodozyma* improved feed efficiency and dry matter digestibility. Evaluating the effect of increasing dietary astaxanthin (0, 5, 10, or 20 mg/kg) on late-finishing pig performance [41], it was found that the growth performance of pigs fed the astaxanthin did not differ from pigs fed a control diet. In our study, astaxanthin was derived from *Haematococcus pluvialis*, which could explain the lack of significant changes between groups compared to work where the source of AST originated from *Phaffia* yeast. However, as shown in studies [42,43], a diet with 133 or 266 mg/kg of *Haematococcus pluvialis* algae caused faster weight gain and significantly higher breast muscle mass, and higher feed efficiency in broiler chickens. Perhaps the AST dose used in this study was too low to be effective in the productivity indicators.

4.2. Blood Indices

Although statistically significant differences were observed between groups, the hematological and biochemical blood indices were within the physiological norms [44], indicating that the use of HI insect meal and astaxanthin did not adversely affect the health status of the weaned piglets. When studying the interaction between *H. illucens* meal and astaxanthin on hematological blood indices, attention should be paid to the effects of these factors both together and separately, as the multi-component nature of insect meal and the specific antioxidant and anti-inflammatory properties of astaxanthin will complement or exclude each other. In the groups where lymphocytes levels were higher than in the other groups, the pigs showed no signs of disease and the rearing parameters remained within normal limits. Similarly [30], it was found that the inclusion of *H. illucens* meal in the diet did not significantly affect the blood and serum indices in pigs, but there was an increase in the number of monocytes and neutrophils as the level of this additive increased. Unexpected in our study was the reduction in hemoglobin level in pigs treated with 5% HI larvae meal. Similarly, in the case of serum iron concentration, the addition of HI meal at both levels resulted in a decrease in this parameter. From a physiological point of view, this is detrimental to the body, as the lower the hemoglobin concentration, the worse the circulation of oxygen in the body, and thus the worse the performance of the animal [45]. The lower serum iron levels in the groups with HI larvae meal only were reflected in the red blood cell distribution width (RDWC; $p < 0.01$) and mean corpuscular hemoglobin (MCH; $p < 0.01$). These results contrast with those [45] that showed that replacing 25%, 50%, 75%, or 100% of fish meal with HI meal did not worsen hematological blood parameters, and RBC, HGB, HCT, and RDW were even higher (however, $p > 0.05$) in groups supplemented with HI meal when compared to the control group. In their experiments, HI meal supplementation significantly decreased the platelets counts, while in the present experiment, this parameter was not affected. The lipid fraction of *Hermetia illucens* larvae contains lauric acid in the amount of about 38.43% by weight [46]. It belongs to the saturated fatty acids that exacerbate dyslipidemia, and it is lauric acid that raises circulating cholesterol levels contributing to cardiovascular disease [47]. In our experiment, the supplementation of feed with 2.5 or 5% HI meal (36.5 g of lauric acid per 100 g of all estimated acids) did not influence the cholesterol content in the blood. In contrast, in the experiment by van Heugten et al. (2022) [34] where the HI larvae oil (36.5–37.3 g of lauric acid/100 g) was used in the amount of 2%, 4%, or 6% in the feed, the increase in total cholesterol level (by about 17% compared to control group) was the only significant effect observed in piglets'

biochemical blood indices. These authors, however, did not notice any effect of lauric acid present in HI oil on the hematological parameters.

One mechanism of cardiovascular disease is erythrosis. Some studies have confirmed that lauric acid in human red blood cells stimulates erythrosis [47]. In addition, the mechanism that affects erythrosis is oxidative stress [48], and this stress, according to the above study, is triggered by lauric acid [47]. Hence, it can be assumed that in the present experiment, exposure to lauric acid, in the form of supplementation of *H. illucens* meal, resulted in a decrease in the level of selected red cell parameters. Analyzing further results, a beneficial effect of astaxanthin on these parameters (RBC, Fe, HCT, RDWC) is noticeable. Thus, it can be thought that astaxanthin partially prevents excessive oxidative stress contributing to erythrosis. The beneficial effect on limiting oxidative stress was confirmed in studies [49] on broiler chickens receiving from 20 to 80 mg/kg of AST, in which increased catalase and superoxide dismutase levels were observed in plasma. Biochemical blood indices were studied by Yu et al. (2020) [36] on weaned piglets receiving 0%, 1%, 2%, or 4% HI meal in a feed. These authors observed that 2% HI meal increased total protein, IL-10, and IgA while decreasing urea and triglyceride concentration. In the present experiment, the concentration of these biochemical indices was not affected by the HI meal supplementation in feed.

4.3. Meat and Backfat Analysis

In the conducted experiment, a significantly higher TBARS value for meat (*longissimus m.*) was noted in the groups receiving astaxanthin, and no effect of HI meal was noticed after storing at -20°C for 3 months. On the other hand, the astaxanthin added to the feed mixture significantly decreased the TBARS value in adipose tissue (backfat) stored in the same conditions. A significant interaction between the experimental factors was also noted: the highest TBARS value for backfat was in the control group, while the most effective combination of dietary supplements for lowering the TBARS was 2.5% of HI meal together with the astaxanthin. The efficiency of these supplements in improving the shelf life of pork fat was about 80% (2.5% HI meal group) and 77% (AST group and AST + 2.5% HI meal) when compared to the control group. TBARS, expressed as malondialdehyde, is a valuable index of lipid peroxidation and oxidative susceptibility. It reflects the degree of oxidation: the higher the TBARS value, the more intensive oxidation of lipids appears. The beneficial effect of astaxanthin was observed in another study [50] when *longissimus m.* chops originated from the astaxanthin-supplemented pigs had TBARS values more than 60% lower than chops from control pigs after 7 days of retail exposure. Improvement in meat quality was also noticed [49] in broiler chickens fed with 20, 40, or 80 mg/kg of AST, which developed the antioxidant status in breast meat, reduced malondialdehyde levels, and increased redness and yellowness of meat. These results suggest a beneficial effect of AST against lipid oxidation. The results are consistent with the antioxidant activity of AST, which helps protect membrane phospholipids and other lipids from peroxidation [51]. However, some studies [37] did not confirm any significant effects of 1.5 or 3 mg of AST supplementation in the feed for fatteners on the meat TBARS value, drip loss, meat color, and marbling values. This additive was fed to pigs for 14 days only, which could be too short of a period for significant meat quality and oxidative stability affection.

In the present experiment, there was a significantly lower percentage of crude ash in the meat of pigs treated with HI larvae meal. A similar result was obtained in another study where the concentration of ash in breast muscles in broiler chickens (*Pectoralis major*) decreased linearly as the proportion of HI larvae meal in the diet increased [52]. The authors attribute this result to the use of full-fat HI larvae meal, which was also used in our experiment.

5. Conclusions

The results of the present study indicate that the inclusion of full-fat meal from *H. illucens* larvae and astaxanthin did not adversely affect feed intake and utilization,

daily weight gains, and organ weights in weaned piglets. Both factors, separately and in interaction, have no negative effect on biochemical and hematological blood parameters, which remained within the norms. It seems that astaxanthin supplemented even in small amounts supports the inhibition of oxidative stress, which became apparent in the case of some red blood cell parameters. The 2.5% full-fat *H. illucens* larvae meal and astaxanthin, used in feed mixture separately or together, can reduce the susceptibility of pork fat to the oxidation process and improve its shelf life. It is suggested that the higher concentration of *H. illucens* meal (5%) should not be used, as the presence of lauric acid can cause adverse changes in some of the red cell indices. However, using the HI meal along with the antioxidant astaxanthin improves these indices.

Author Contributions: Conceptualization, M.Ś. and K.S.; methodology, M.Ś., K.S. and I.F.-D.; software, K.S. and Ł.G.; validation, K.S., M.Ś. and I.F.-D.; formal analysis, K.S. and M.Ś.; investigation, K.S., Ł.G. and M.Ś.; resources, I.F.-D., Ł.G. and K.S.; data curation, K.S., I.F.-D., Ł.G. and M.Ś.; writing—original draft preparation, K.S. and M.Ś.; writing—review and editing, K.S. and M.Ś.; visualization, K.S. and M.Ś.; supervision, M.Ś.; project administration, M.Ś.; funding acquisition, M.Ś. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding. This research was supported by the statutory activity of National Research Institute of Animal Production in Poland (project number: 01-16-06-11).

Institutional Review Board Statement: All procedures included in this study relating to the use of live animals agreed with the First Local Ethics Committee for Experiments with Animals in Cracow (Protocol code: 420/2020, date: 22 July 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data supporting reported results are in the possession of the authors (K.S. and M.Ś.)

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Pluske, J.R.; Hampson, D.J.; Williams, I.H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: A review. *Livest. Prod. Sci.* **1997**, *51*, 215–236. [[CrossRef](#)]
2. Campbell, J.M.; Crenshaw, J.D.; Polo, J. The biological stress of early weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2013**, *4*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Xiong, X.; Tan, B.; Song, M.; Ji, P.; Kim, K.; Yin, Y.; Liu, Y. Nutritional Intervention for the intestinal development and health of weaned pigs. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kaewwongsa, W.; Traiyakun, S.; Yuangklang, C.; Wachirapakorn, C.; Paengkoum, P. Protein enrichment of cassava pulp fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Anim. Vet. Adv.* **2011**, *10*, 2434–2440.
5. Parisi, G.; Tulli, F.; Fortina, R.; Marino, R.; Bani, P.; Zotte, A.D.; de Angelis, A.; Piccolo, G.; Pinotti, L.; Schiavone, A.; et al. Protein hunger of the feed sector: The alternatives offered by the plant world. *Ital. J. Anim. Sci.* **2020**, *19*, 1204–1225. [[CrossRef](#)]
6. Lu, S.; Taethaisong, N.; Meethip, W.; Surakhunthod, J.; Sinpru, B.; Sroichak, T.; Purba, R.A.P.; Paengkoum, S.; Thongpea, S.; Archa, S.; et al. Nutritional composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) and its potential uses as alternative protein sources in animal diets: A review. *Insects* **2022**, *13*, 831. [[CrossRef](#)]
7. Józefiak, D.; Józefiak, A.; Kierończyk, B.; Rawski, M.; Świątkiewicz, S.; Długosz, J.; Engberg, M.R. Insects—A natural nutrient source for poultry—A review. *Ann. Anim. Sci.* **2016**, *16*, 297–313. [[CrossRef](#)]
8. Seyedalmoosavi, M.M.; Mielenz, M.; Veldkamp, T.; Daş, G.; Metges, C.C. Growth efficiency, intestinal biology, and nutrient utilization and requirements of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae compared to monogastric livestock species: A review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2022**, *13*, 31. [[CrossRef](#)]
9. Elsayed, M.; Li, W.; Abdalla, N.S.; Ai, P.; Zhang, Y.; Abomohra, A.E.F. Innovative approach for rapeseed straw recycling using black solider fly larvae: Towards enhanced energy recovery. *Renew. Energ.* **2022**, *188*, 211–222. [[CrossRef](#)]
10. Mikołajczak, Z.; Mazurkiewicz, J.; Rawski, M.; Kierończyk, B.; Józefiak, A.; Świątkiewicz, S.; Józefiak, D. Black soldier fly full-fat meal in Atlantic salmon nutrition—Part A: Effects on growth performance, feed utilization, selected nutriphysiological traits and production sustainability in fries. *Ann. Anim. Sci.* **2022**. [[CrossRef](#)]
11. Lock, E.R.; Arsiwalla, T.; Waagbø, R. Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolt. *Aquac. Nutr.* **2016**, *22*, 1202–1213. [[CrossRef](#)]

12. Kowalska, J.; Rawski, M.; Homska, N.; Mikołajczak, Z.; Kierończyk, B.; Świątkiewicz, S.; Wachowiak, R.; Hetmańczyk, K.; Mazurkiewicz, J. The first insight into full-fat superworm (*Zophobas morio*) meal in guppy (*poecilia reticulata*) diets: A study on multiple-choice feeding preferences and growth performance. *Ann. Anim. Sci.* **2022**, *22*, 371–384. [[CrossRef](#)]
13. Oonicx, D.G.A.B.; de Boer, I.J.M. Environmental impact of the production of mealworms as a protein source for humans—A life cycle assessment. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e51145.
14. Józefiak, A.; Engberg, R.M. Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. *J. Anim. Feed. Sci.* **2017**, *26*, 87–99. [[CrossRef](#)]
15. Gasco, L.; Józefiak, A.; Henry, M. Beyond the protein concept: Health aspects of using edible insects on animals. *J. Insects Food Feed* **2020**, *7*, 715–741. [[CrossRef](#)]
16. Nussey, D.H.; Pemberton, J.M.; Pilkington, J.G.; Blount, J.D. Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Funct. Ecol.* **2009**, *23*, 809–817. [[CrossRef](#)]
17. Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2007**, *39*, 44–84. [[CrossRef](#)]
18. Catoni, C.; Peters, A.; Schaefer, H.M. Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Anim. Behav.* **2008**, *76*, 1107–1119. [[CrossRef](#)]
19. Xuan, R.R.; Niu, T.T.; Chen, H.M. Astaxanthin blocks preeclampsia progression by suppressing oxidative stress and inflammation. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 2697–2704. [[CrossRef](#)]
20. Igierska-Kalwat, J.; Gościanska, J.; Nowak, I. Karotenoidy jako naturalne antyoksydanty. *Post. Hig. Med. Dosw.* **2015**, *69*, 418–428. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, F.; Zhu, J.; Zhang, Z.; Yang, S.; Yu, Z.; Liu, C.; Hong, P. Effects of black soldier fly meal on growth performance, serum indices and nutrient apparent digestibility in growing-finishing pigs. *J. Henan Agric. Sci.* **2017**, *46*, 130–146.
22. Macedo, R.C.; Bolin, A.P.; Marin, D.P.; Otton, R. Astaxanthin addition improves human neutrophils function: In vitro study. *Eur. J. Nutr.* **2010**, *49*, 447–457. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Grela, E.R.; Skomiał, J. *Zalecenia żywieniowe i Wartość Pokarmowa Pasz dla Świń*; The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences: Jabłonna, Poland, 2020.
24. AOAC. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18th ed.; Association of Official Analytical Chemists: Gaithersburg, MD, USA, 2005.
25. Hoffmann, L.; Schiemann, R. Von der kalorie zum joule: Neue größenbeziehungen bei messungen des energieumsatzes und bei der berechnung vonkennzahlen der energetischen futterbewertung. *Arch. Tierernaehr.* **1980**, *30*, 733–742. [[CrossRef](#)]
26. Pikul, J.; Leszczyński, D.E.; Kummerow, F.A. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J. Agr. Food Chem.* **1989**, *37*, 1309–1313. [[CrossRef](#)]
27. *Statistica (Data Analysis Software System)*, Version 13.3; StatSoft Software Dell Inc.: Palo Alto, CA, USA, 2017.
28. Yu, M.; Li, Z.; Chen, W.; Rong, T.; Wang, G.; Li, J.; Ma, X. Use of *Hermetia illucens* larvae as a dietary protein source: Effects on growth performance, carcass traits, and meat quality in finishing pigs. *Meat Sci.* **2019**, *158*, 107837. [[CrossRef](#)]
29. Ipema, A.F.; Bokkers, E.A.M.; Gerrits, W.J.J.; Kemp, B.; Bolhuis, J.E. Providing live black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) improves welfare while maintaining performance of piglets post-weaning. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7371. [[CrossRef](#)]
30. Biasato, I.; Renna, M.; Gai, F.; Dabbou, S.; Meneguz, M.; Perona, G.; Martinez, S.; Lajusticia, A.C.B.; Bergagna, S.; Sardi, L.; et al. Partially defatted black soldier fly larva meal inclusion in piglet diets: Effects on the growth performance, nutrient digestibility, blood profile, gut morphology and histological features. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2019**, *10*, 12. [[CrossRef](#)]
31. Spranghers, T.; Michiels, J.; Vrancx, J.; Ovyn, A.; Eeckhout, M.; de Clercq, P.; de Smet, S. Gut antimicrobial effects and nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) prepupae for weaned piglets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2018**, *235*, 33–42. [[CrossRef](#)]
32. Driemeyer, H. Evaluation of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae as an Alternative Protein Source in Pig Creep Diets in Relation to Production, Blood, and Manure Microbiology Parameters. Doctoral Dissertation, Stellenbosch University, Stellenbosch, Africa, 2016.
33. Chia, S.Y.; Tanga, C.M.; Osuga, I.M.; Alaru, A.O.; Mwangi, D.M.; Githinji, M.; Dubois, T.; Ekesi, S.; van Loon, J.J.A.; Dicke, M. Black soldier fly larval meal in feed enhances growth performance, carcass yield and meat quality of finishing pigs. *J. Insects Food Feed.* **2021**, *7*, 433–447. [[CrossRef](#)]
34. Van Heugten, E.V.; Martinez, G.; McComb, A.; Koutsos, L. Improvements in performance of nursery pigs provided with supplemental oil derived from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Animals* **2022**, *12*, 3251. [[CrossRef](#)]
35. Håkenåsen, I.M.; Grepperud, G.H.; Hansen, J.Ø.; Øverland, M.; Ånestad, R.M.; Mydland, L.T. Full-fat insect meal in pelleted diets for weaned piglets: Effects on growth performance, nutrient digestibility, gastrointestinal function, and microbiota. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2021**, *281*, 115086. [[CrossRef](#)]
36. Yu, M.; Li, Z.; Chen, W.; Rong, T.; Wang, G.; Wang, F.; Ma, X. Evaluation of full-fat *Hermetia illucens* larvae meal as a fishmeal replacement for weanling piglets: Effects on the growth performance, apparent nutrient digestibility, blood parameters and gut morphology. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2020**, *264*, 114431. [[CrossRef](#)]
37. Yang, Y.X.; Kim, Y.J.; Jin, Z.; Lohakare, J.D.; Kim, C.H.; Ohh, S.H.; Lee, S.H.; Choi, J.Y.; Chae, B.J. Effects of dietary supplementation of astaxanthin on production performance, egg quality in layers and meat quality in finishing pigs. *Asian Aust. J. Anim.* **2006**, *19*, 1019–1025. [[CrossRef](#)]

38. Ao, X.; Kim, I.H. Effects of astaxanthin produced by *Phaffia rhodozyma* on growth performance, antioxidant activities, and meat quality in Pekin ducks. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 4954–4960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Jeong, J.S.; Kim, I.H. Effect of astaxanthin produced by *Phaffia rhodozyma* on growth performance, meat quality, and fecal noxious gas emission in broilers. *Poult. Sci.* **2014**, *93*, 3138–3144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Lei, Y.; Kim, I.H. Effect of *Phaffia rhodozyma* on performance, nutrient digestibility, blood characteristics, and meat quality in finishing pigs. *J. Anim. Sci.* **2014**, *92*, 171–176. [[CrossRef](#)]
41. Bergstrom, J.R.; Nelssen, J.L.; Houser, T.; Gunderson, J.A.; Gipe, A.N.; Jacela, J.; Benz, J.M.; Sulabo, R.C.; Tokac, M.D. Effects of dietary astaxanthin on the growth performance and carcass characteristics of finishing pigs. *Fish. Pig Nutr. Manag.* **2009**, *0*, 239–244. [[CrossRef](#)]
42. Inborr, J.; Lignell, Å. Effect of feeding astaxanthin-rich algae meal (*Haematococcus pluvialis*) on performance and carotenoid concentration of different tissues of broiler chickens. In Proceedings of the 13th WPSA Conference on Poultry Meat Quality in Poznan 1997 (Poland: Session M1), Poznan, Poland, 22–25 September 1997; pp. 39–43.
43. Inborr, J. Haematococcus, the Poultry Pigmentor. *Feed Mix.* **1998**, *6*, 31–34.
44. Winnicka, A. Wartości referencyjne podstawowych badań laboratoryjnych w weterynarii (Reference values in basic laboratory analyses in veterinary medicine). *Polish. Wydawnictwo Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego Warszawa* **2008**, *99*, 17–39.
45. Chia, S.Y.; Tanga, C.M.; Osuga, I.M.; Alaru, A.O.; Mwangi, D.M.; Githinji, M.; Subramanian, S.; Fiaboe, K.K.; Ekesi, S.; van Loon, J.J. Effect of dietary replacement of fishmeal by insect meal on growth performance, blood profiles and economics of growing pigs in Kenya. *Animals* **2019**, *9*, 705. [[CrossRef](#)]
46. Ushakova, N.; Brodskii, E.; Kovalenko, A.; Bastrakov, A.; Kozlova, A.; Pavlov, D. *Characteristics of Lipid Fractions of Larvae of the Black Soldier Fly Hermetia Illucens*; Doklady Biochemistry and Biophysics; Springer: Berlin, Germany, 2016; pp. 209–212.
47. Alfhili, M.A.; Aljuraiban, G.S. Lauric acid, a dietary saturated medium-chain fatty acid, elicits calcium-dependent eryptosis. *Cells* **2021**, *10*, 3388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lang, F.; Abed, M.; Lang, E.; Foller, M. Oxidative stress and suicidal erythrocyte death. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *21*, 138–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. El Basuini, M.F.; El-Bilawy, E.H.; Kari, Z.A.; Raza, S.H.A.; Tapingkae, W.; van Doan, H.; Dawood, M.A.O. Pharmacotherapeutic potential of astaxanthin: Human and animal targeting roles—A review. *Ann. Anim. Sci.* **2022**, *22*, 829–838. [[CrossRef](#)]
50. Carr, C.C.; Johnson, D.D.; Brendemuhl, J.H.; Gonzalez, J.M. Fresh pork quality and shelf-life characteristics of meat from pigs supplemented with natural astaxanthin in the diet. *Prof. Anim. Sci.* **2010**, *26*, 18–25. [[CrossRef](#)]
51. Palozza, P.; Krinsky, N.I. Astaxanthin and canthaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *297*, 291–295. [[CrossRef](#)]
52. Daszkiewicz, T.; Murawska, D.; Kubiak, D.; Han, J. Chemical composition and fatty acid profile of the pectoralis major muscle in broiler chickens fed diets with full-fat black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal. *Animals* **2022**, *12*, 464. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin on intestinal histology and expression of tight junction proteins in weaned piglets

Kinga Szczepanik¹  | Piotr Dobrowolski² | Małgorzata Świątkiewicz¹ 

¹Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, Balice, Poland

²Department of Functional Anatomy and Cytobiology, Maria Curie-Skłodowska University, Lublin, Poland

Correspondence

Kinga Szczepanik, Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, Krakowska St. 1, 32-083 Balice, Poland.

Email: kinga.szczepanik@iz.edu.pl

Piotr Dobrowolski, Department of Functional Anatomy and Cytobiology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka St. 19, 20-033 Lublin, Poland.

Email: piotr.dobrowolski@umcs.lublin.pl

Funding information

Instytut Zootechniki—Panstwowy Instytut Badawczy

Abstract

The weaning phase in piglets causes significant physiological stress, disrupts intestinal integrity and reduces productivity, necessitating strategies to improve intestinal health and nutrient absorption. While current research highlights the role of diet in mitigating these adverse effects, identifying effective dietary supplements remains a challenge. This study evaluated the effects of *Hermetia illucens* (HI) larvae meal and astaxanthin (AST) on the intestinal histology of weaned piglets. In a controlled experiment, 48 weaned piglets were divided into six groups and received varying levels of HI larval meal (2.5% and 5%) and AST in their diets. The methodology involved comprehensive histological examinations of the small intestine, assessing absorption area, villi elongation, crypt depth, goblet cells, enterocytes and expression of ileal tight junction (TJ) proteins. The study found that HI larval meal significantly improved nutrient absorption in the jejunum and ileum ($p < 0.001$), thereby enhancing feed conversion. AST supplementation increased the number of enterocytes ($p < 0.001$). Both HI larval meal and AST positively affected intestinal morphology and function, increasing muscularis muscle mass and villi elongation ($p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively). The 2.5% HI meal improved the villi length to crypt depth ratio and slightly increased the goblet cell count (both $p < 0.05$). Ki-67 antibody analysis showed increased cell proliferation in the duodenal and jejunal crypts, particularly with the 2.5% HI meal ($p < 0.001$). Insect meal did not affect TJ protein expression, indicating that it had no effect on intestinal permeability. These findings suggest that HI larval meal and AST can enhance the intestinal wellness and productivity of weaned piglets.

KEY WORDS

astaxanthin, *Hermetia illucens* meal, intestine histology, piglets feeding, tight junction proteins, weaning stress

1 | INTRODUCTION

One of the most sensitive moments in a pig's life is the weaning period (Campbell et al., 2013). During this time, changes in the environment, diet and social conditions generate stress. Weaning impairs intestinal integrity, disrupts digestive and absorption capacities and increases intestinal oxidative stress (Campbell et al., 2013; Xiong et al., 2019), and this has a negative impact on the subsequent productivity of animals and, thus, on the profitability of pig production. Studies have indicated that significant changes in the histology and biochemistry of the small intestine, such as villous atrophy and hypertrophy of the crypts, are closely associated with this period (Hampson, 1986; Pluske et al., 1997). Hampson's (1986) study showed that piglets weaned at 21 days of age experienced a reduction in villi height of approximately 25%–35% of their preweaning height within the first 24 h. The decrease in villi height continued until about 5–7 days after weaning, at which time the villi were about half their initial height. In addition, the pigs showed a highly significant increase in crypt depth and villi morphology complexity. The crypts deepened most in the distal part of the small intestine, while the loss of villi height was greatest in the proximal part. Improving intestinal development and health is key to increasing nutrient absorption capacity and disease resistance in piglets and is associated with increased survival rates (Xiong et al., 2019). Hence, owing to the reduction in the use of feed antibiotics, researchers are trying nutritional interventions to prevent the negative effects of weaning without involving prohibited substances (Pettigrew, 2006). Optimization of feed composition and supplementation with various feed additives are among the measures used to improve the health status of piglets (Kil & Stein, 2010). In addition, an easily digestible protein with a favourable amino acid composition is recommended for growing young organisms (Lallès et al., 2007). Recently, interest in black soldier larvae (*Hermetia illucens*; HI) as a sustainable protein source for livestock has increased significantly (Mikołajczak et al., 2023). Currently, there are two types of *H. illucens* larvae meal in feedstuffs: defatted and full-fat, which differ in fat and saturated fatty acid content (Lu et al., 2022). The experiment described in this manuscript used full-fat *H. illucens* larval meal. The choice of this species dictates a very promising composition: lauric acid, antibacterial molecules (AMPs), chitin and a favourable amino acid composition of proteins. HI meal is a potential source of antimicrobial peptides with antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. In addition, the larvae contain chitin, which is a probiotic for commensal bacteria that inhibits the proliferation of pathogenic bacteria properties. In addition, studies have shown that HI meal affects the intestinal microflora, which may be related to its high content of AMPs and fatty acids, which provide energy, lower intestinal pH and inhibit the proliferation of pathogenic bacteria (Schiavone et al., 2017; Tang et al., 2022; Vogel et al., 2018; Waśko et al., 2016). HI meal modulates intestinal microflora, enhances mucosal immunity and improves nutrient absorption (Rimoldi et al., 2024). Stelios et al. (2024) found that insect proteins can act as prebiotics, promoting the growth of beneficial gut bacteria and

improving gut health. Weaning stress also increases oxidation levels, leading to the formation of free radicals. These, in turn, can modify certain cellular proteins and activate the upregulation of proinflammatory cytokines, contributing to the impaired expression of TJ proteins and increased intestinal permeability (Xiong et al., 2019). Studies have indicated that weaning stress is a major cause of loss of intestinal barrier function in early weaned pigs, promotion of free radical generation and reduced antioxidant activity (Zhu et al., 2012). Therefore, the use of antioxidants is promoted to protect the intestinal epithelium from free radicals. In addition, a study showed that the use of antioxidants in weaned piglets increased the height of villi in the jejunum and the width of villi in the jejunum and ileum, compared to the group without these additives (Zhu et al., 2012). Therefore, in this study, we evaluated the effects of astaxanthin (AST), a potent natural antioxidant. The antioxidant properties of AST are 14 times greater than those of vitamin E, 54 times greater than those of β-carotene and 65 times greater than those of vitamin C (Igielska-Kalwat et al., 2015). It has been reported that AST exerts protective effects on the gastrointestinal tract through several mechanisms. First, AST helps reduce the bacterial load, lowering the infection risk. In addition, it modulates the immune response by enhancing the body's ability to fight pathogens and maintain intestinal health. Furthermore, AST inhibits the proliferation of cancer cells, contributing to its potential role in cancer prevention in the gastrointestinal system. Additionally, AST protects cells against apoptosis by regulating mitochondrial proteins (MacEdo et al., 2010). Our previous results presented by Szczepanik et al. (2023) suggested that both supplements should be supplemented together to improve red cell parameters.

This study aimed to investigate the effects of *H. illucens* larvae meal and AST on intestinal histology and TJ in weaned piglets. Given the growing demand for new protein sources and the common health issues in postweaning piglets, the authors explored whether these dietary factors could provide solutions.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethical statement

All procedures included in this study relating to the use of live animals agreed with the First Local Ethics Committee for Experiments with Animals in Cracow, Poland (Resolution No. 420/2020, date 22.07.2020). Throughout the experimental period, the health status of the postweaning pigs was regularly monitored by a veterinarian.

2.2 | Animals and experimental diets

The experiment was conducted on 48 35-day-old postweaning pigs (barrows) weighing approximately 8.7 kg (± 0.2 kg). The barrows were of the Polish Landrace (PL) breed. The pigs were divided into six groups, with eight pigs in each: group I—control, feed mixture without

supplementation; group II—addition of 2.5% *H. illucens* (HI) larvae meal; group III—addition of 5% HI larvae meal; group IV—addition of 2.5% HI larvae meal and AST; group V—addition of 5% HI larvae meal and AST; and group VI—addition of AST. *H. illucens* larvae meal is a full-fat product obtained from commercial sources (HiProMine S.A.). Chemical analyses showed that HI larvae meal contained (on a feed basis) 426 g of crude protein, 264 g of ether extract, 91 g of crude fibre, 85 g of crude ash and 945 g of dry matter—per kg of the meal. AST originated from *Haematococcus pluvialis* (Podkowa AD 1905 sp. z o.o.) and was added at 0.025 g per 1 kg of feed mixture (in groups IV, V, VI). The antioxidant properties of AST were analysed using two methods, FRAP (ferric reducing antioxidant power) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Both methods showed strong antioxidant activity of AST: DPPH 91% inhibition, FRAP 298.34 µm TE/g. All piglets were fed an isoprotein and isoenergetic diet that met the Polish standards for pig feeding (Grela & Skomiał, 2020). The composition of ingredients and nutritional values of diets have been described in detail by Szczepanik et al. (2023; Table S1). Basic chemical analyses of the feed mixture samples were performed according to standard methods (AOAC [Association of Official Analytical Chemists], 2009). Experimental fattening lasted for 35 days. The pigs were housed in individual pens and provided feed and water ad libitum. The pigs were kept in a mechanically ventilated room, maintaining a temperature of 18–20°C. However, during the initial acclimatization phase, heating lamps were used to elevate the surrounding temperature to approximately 28°C. The air humidity of the room averaged approximately 55%, with an air exchange of 15×/h, and a natural day/night light cycle was maintained. At the end of the experiment, all pigs were slaughtered. The animals were killed with an approved standard method by simply stunning with a specialized penetrating pin device Blitz.

2.3 | Sampling collections

Samples of the small intestinal segments (duodenum, jejunum and ileum) were obtained and processed for histological analysis. Briefly, a section of the duodenum (taken 2 cm from the stomach), jejunum (taken halfway along its length) and ileum (taken 2 cm before the ileocecal junction) were rinsed with saline solution and placed in buffered formaldehyde solution (4%). After 24 h, the fragments were cut into approximately 0.5 cm sections and placed in histology cassettes, followed by dehydration in graded ethanol solutions (up to 70%).

2.4 | Histology and histomorphometry

The cassettes were placed in a tissue processor, where a cycle of transitions in ethanol (Idalia), non-polar solvent (Xylene; Idalia) and paraffin (Histoplast; Thermo Shandon Limited) permeabilization was set. Two paraffin blocks were prepared from each intestinal sample to increase the reliability of the results. Two slides were made from

each paraffin block, and two slides were made; the blocks were cut using a microtome (Microm HM 340 E; Thermo Scientific) into 4 µm sections. Preparations from intestinal tissues were stained using the Pas-Alcian method, which allows the counting of goblet cells. Stained slides were observed under a light microscope (Axio Lab.A1 Carl Zeiss) equipped with an Olympus EP50 microscope (Olympus). Collected microscopic images were examined using the following graphical analysis software: EPview (Olympus) and ImageJ (version 1.53; US National Institutes of Health). In the duodenum, jejunum and ileum, the following parameters were analysed: mucosa, length (from the tip of the villus to the villus–crypt junction), and width (measured in the middle of the villi length) of villi, depth (depth of the invagination between adjacent villi), width (measured in the middle of the crypt depth) of crypts, number of goblet cells, and enterocytes per 100 µm section of villi (measured at 2/3 of the length of the entire villi measured from the base), the width of the muscularis distinguishing between the longitudinal and circular muscle layers, and the ratio of villus length to crypt depth. Only vertically oriented villi and crypts were measured. For each individual, 20 measurements were taken of the mucosa and muscularis, and 15 measurements were taken of goblet cells and enterocytes, villi length and width and crypt depth and width.

The absorptive areas of the duodenum, jejunum and ileum were determined, as described by Kisielinski et al. (2002).

2.5 | Immunohistochemistry (IHC)

For Ki-67 analysis, slides from the duodenum, jejunum and ileum were prepared, and a representative sample from the jejunum of the small intestine was prepared for TJ protein analysis. The tissues were placed on adherent slides. Immunohistochemical staining for Ki-67, claudin 5, claudin 1 and occludin was performed after deparaffinization in xylene and rehydration with reduced concentrations of ethanol and distilled water. Heat-induced epitope recovery was performed in sodium citrate buffer (10 mM sodium citrate, pH 6.0) using a Rapid Cook pressure cooker (Morphy Richards). The sections were then cooled to room temperature and washed five times with Tris-buffered saline (TBS) buffer. The slides were then incubated in an antibody-blocking solution (UltraCruz® Blocking Reagent; Santa Cruz Biotechnology) for 30 min at room temperature. To block non-specific binding, the slides were incubated in 5% goat serum solution (ab7481; Abcam) for 20 min at room temperature. The slides were washed three times with TBS buffer. The slides were then incubated with primary antibodies against Anti-Ki67 (ab15580, Abcam; dilution 1:200), claudin 5 (AF5216; Affinity), claudin 1 (AF0127; Affinity) and occludin (DF7504; Affinity) for 1 h at room temperature in a humid chamber. The slides were washed five times with TBS. The preparations were then incubated for 40 min with Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) (ab6721, Abcam; dilution 1:1000) at room temperature. The slides were washed five times with TBS buffer. Emerald Antibody Diluent (Sigma; Merck Life Science) was used as a diluent for the antibodies. The reaction was visualized for 3 min using DAB

Quanto (Epredia™ DAB Quanto Detection System). Contrast staining was performed using Mayer's hematoxylin (Sigma-Aldrich). Immunoreaction was verified using negative controls subjected to identical immunohistochemical staining, excluding the use of primary antibodies.

For Ki-67 staining, five regions of interest (ROIs) within the mucosa were delineated for each animal to include sections of the villi and adjacent crypts. In each ROI, the number of positive cells (undergoing proliferation) was calculated using the Cell Counter plug-in of the ImageJ software (based on Vega-López et al., 1993 with minor modifications). For TJ protein analysis, eight areas of interest within the villus epithelium were selected for each animal. The ROIs had the same dimensions in each image analysed within each animal and group. An IHC profiler (ImageJ plugin) was used for quantitative IHC analysis using colour deconvolution and computerized pixel profiling, leading to the automatic scoring of the corresponding image. IHC Profiler generates a DAB image histogram profile corresponding to the number of pixel intensity counts and automatically calculates the score. The result is displayed in a semi-quantitative manner, which is used to calculate the IHC optical density using a formula (Seyed Jafari & Hunger, 2017; Varghese et al., 2014).

2.6 | Statistical analysis

Data are presented as mean and standard deviation and were analysed by two-way ANOVA followed by a post hoc Tukey's honest significant difference test to correct for multiple comparisons using Statistica® ver. 13.3 software packages (StatSoft) and GraphPad Prism version 10.0.2 for Windows (GraphPad Software). A two-sided significance level (*p*-value) of less than 0.05 was considered statistically significant. The model included two main factors: (1) HI larvae meal share (2.5% vs. 5%), and (2) the presence of AST in the feed mixture and their interactions. Each piglet served as an experimental unit (*n* = 8 per group). The normal distribution of the data was confirmed using the W Shapiro-Wilk test, and the equality of variance was verified using the Brown-Forsythe test. In the absence of a normal distribution, a logarithmic transformation was used to obtain one.

3 | RESULTS

Daily in-depth observations (feed intake, behaviour and mobility) demonstrated that the piglets showed no signs of disease, indicating that the weaning procedure was correct and that no adverse health situations occurred during rearing.

3.1 | Histology

3.1.1 | Duodenum

Supplementation with 2.5% HI + AST caused a significant increase in the total thickness of the muscularis, and circular muscle layer

(*p* < 0.001) compared to the other groups receiving AST, as well as animals supplemented with 2.5% HI but without AST. The longitudinal muscularis was also wider (*p* < 0.001) in the 2.5% HI + AST group than in the 2.5% HI group and animals supplemented only with AST (*p* < 0.01). Higher and wider villi were observed in the 2.5% HI + AST group than in the 5% HI + AST group (*p* < 0.05) and the group supplemented only with AST (*p* < 0.05). The addition of AST alone to the feed caused an increase in the depth of crypts compared to the group without this addition (*p* < 0.001), and the groups 2.5% HI + AST and 5% HI + AST (*p* < 0.001 and *p* < 0.01, respectively). Wider crypts were noted in the 2.5% HI group than in the 2.5% HI + AST group (*p* < 0.05). The highest ratio of villi length to crypt depth was observed in the 2.5% HI + AST group than in the AST alone group (*p* < 0.001), 5% HI + AST (*p* < 0.05) and 2.5% HI (*p* < 0.05). However, this parameter was significantly higher in animals that did not receive AST or HI supplementation than in those that received AST alone (*p* < 0.05). More enterocytes per 100 µm were observed in the AST group than in the control group (*p* < 0.05). Conversely, more goblet cells per 100 µm were recorded in the 2.5% HI (*p* < 0.01) and AST alone (*p* < 0.05) groups than in the 2.5% HI + AST group (Figure 1). Overall, the simultaneous administration of 2.5% HI meal and AST affected villi dilatation and elongation, as well as muscularis dilatation, while reducing the number of goblet cells. There were no significant differences in the mucosal thickness or absorptive surface in the duodenum.

3.1.2 | Jejunum

AST, together with 5% HI, caused a significant widening of the jejunal mucosa compared to that in the group receiving 5% HI only (*p* < 0.01). The thickest muscularis was found in the 5% HI + AST group, which was significantly thicker than that in the AST alone group (*p* < 0.05) and the 5% HI group (*p* < 0.05). Interestingly, the group without HI or AST had a thicker muscularis than the AST group (*p* < 0.05). The longitudinal muscle layer was wider in the 5% HI + AST group than in the 5% HI group (*p* < 0.05). The shortest villi were observed in the group without additives compared to the groups with 2.5% HI (*p* < 0.05) and AST alone (*p* < 0.05), whereas the longest villi were observed in the 5% HI + AST group compared to the 5% HI group (*p* < 0.05). Additionally, the addition of 2.5% HI and AST significantly widened villi compared to the AST alone (*p* < 0.01) and 2.5% HI groups (*p* < 0.01), as well as in the 5% HI + AST group compared to the AST alone (*p* < 0.05) and 2.5% HI groups (*p* < 0.05). The narrowest crypts were observed in the AST-alone group compared to the group without additives (*p* < 0.05), the 2.5% HI + AST group (*p* < 0.01) and the 5% HI + AST group (*p* < 0.05). A significantly larger intestinal absorptive surface and higher villi-to-crypt ratio were present in the AST-alone group (*p* < 0.001 and *p* < 0.05, respectively) and in the 2.5% HI group (both *p* < 0.05) compared to the group without additives. The highest number of enterocytes was found in the jejunum of pigs that did not receive any additives in the feed, compared to the 2.5% HI (*p* < 0.001) and AST alone (*p* < 0.001)

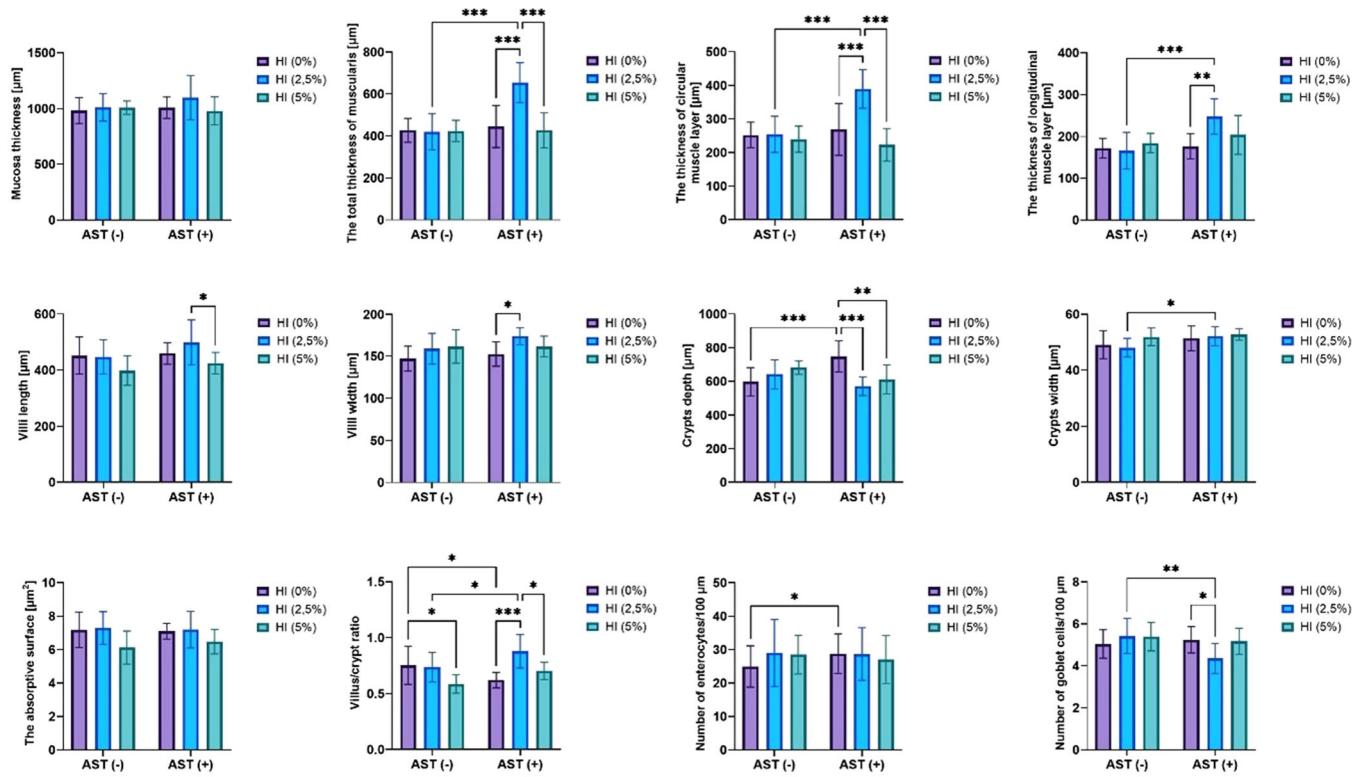


FIGURE 1 Effect of feed supplementation on the duodenal structure. AST, astaxanthin (−) without and (+) with supplementation; HI, *Hermetia illucens* with percentages. Villus/crypt ratio: ratio of villus length to crypt depth. Columns represent means, and whiskers represent standard deviations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

groups. Furthermore, animals receiving 5% HI had enterocyte numbers almost as high as those in the 2.5% HI ($p < 0.01$) and 5% HI + AST ($p < 0.001$) groups. More goblet cells were observed in the group without additives than in the group treated with AST alone ($p < 0.05$). Overall, the combination of 5% HI and AST appears to significantly improve various morphological features of the jejunum, including mucosal dilatation, muscularis thickness and villi dimensions, compared to either supplement alone. These results suggest a synergistic effect when AST is combined with 5% HI. No significant differences were found in the crypt depth or thickness of the circular muscle layer between the groups (Figure 2).

3.1.3 | Ileum

Feed supplementation with 2.5% HI + AST caused a significant increase in the total muscularis in the ileum compared to that in both the 2.5% HI group ($p < 0.001$) and the 5% HI + AST group ($p < 0.01$). The muscle layer was also evidently thicker in the AST-supplemented group than in the non-supplemented group ($p < 0.05$). Dipper's insight into the muscularis revealed more differences in the circular muscles. Supplementation with 2.5% HI + AST increased the thickness of this layer compared to both the 2.5% HI ($p < 0.001$) and 5% HI + AST groups ($p < 0.01$). Moreover, the circular muscles were significantly thicker in the AST-supplemented group than in the 5% HI + AST

($p < 0.01$) and non-supplemented groups ($p < 0.001$). Fewer changes were observed in the longitudinal muscles. A thicker longitudinal muscle layer was observed in the 2.5% HI + AST group than in the 2.5% HI ($p < 0.001$) and 5% HI + AST groups ($p < 0.05$). Supplementation with HI at both 2.5% and 5% doses caused a significant increase in villus length compared to the non-supplemented group ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively). Furthermore, longer villi were observed in the 5% HI + AST group than in the 2.5% HI + AST ($p < 0.01$) and AST alone groups ($p < 0.01$). Significantly wider villi were found in the 2.5% HI + AST group than in the AST alone ($p < 0.01$) and 2.5% HI groups ($p < 0.01$). Moreover, wider villi were observed in the 5% HI + AST group than in the 5% HI group ($p < 0.05$). Deeper crypts were recorded in the 5% HI + AST group than in the AST alone group ($p < 0.05$) and the 2.5% HI + AST group ($p < 0.01$). Differences in the absorptive surface mostly reflected those observed in the villi length. Supplementation with HI caused a significant increase in the absorptive surface in the ileum both at 2.5% and 5% compared to the control without HI ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). The absorptive surface area in the 5% HI + AST group was the highest among the groups supplemented with AST ($p < 0.01$ vs. AST without HI, and $p < 0.001$ vs. 2.5% HI + AST). However, supplementation with AST decreased absorptive surface in a group with 2.5% HI + AST compared with 2.5% HI alone ($p < 0.01$). A higher ratio of villus length to crypt depth was observed in the 5% HI group than in the non-supplemented group ($p < 0.05$). Fewer enterocytes per 100 μm were found in the 5% HI group than in both

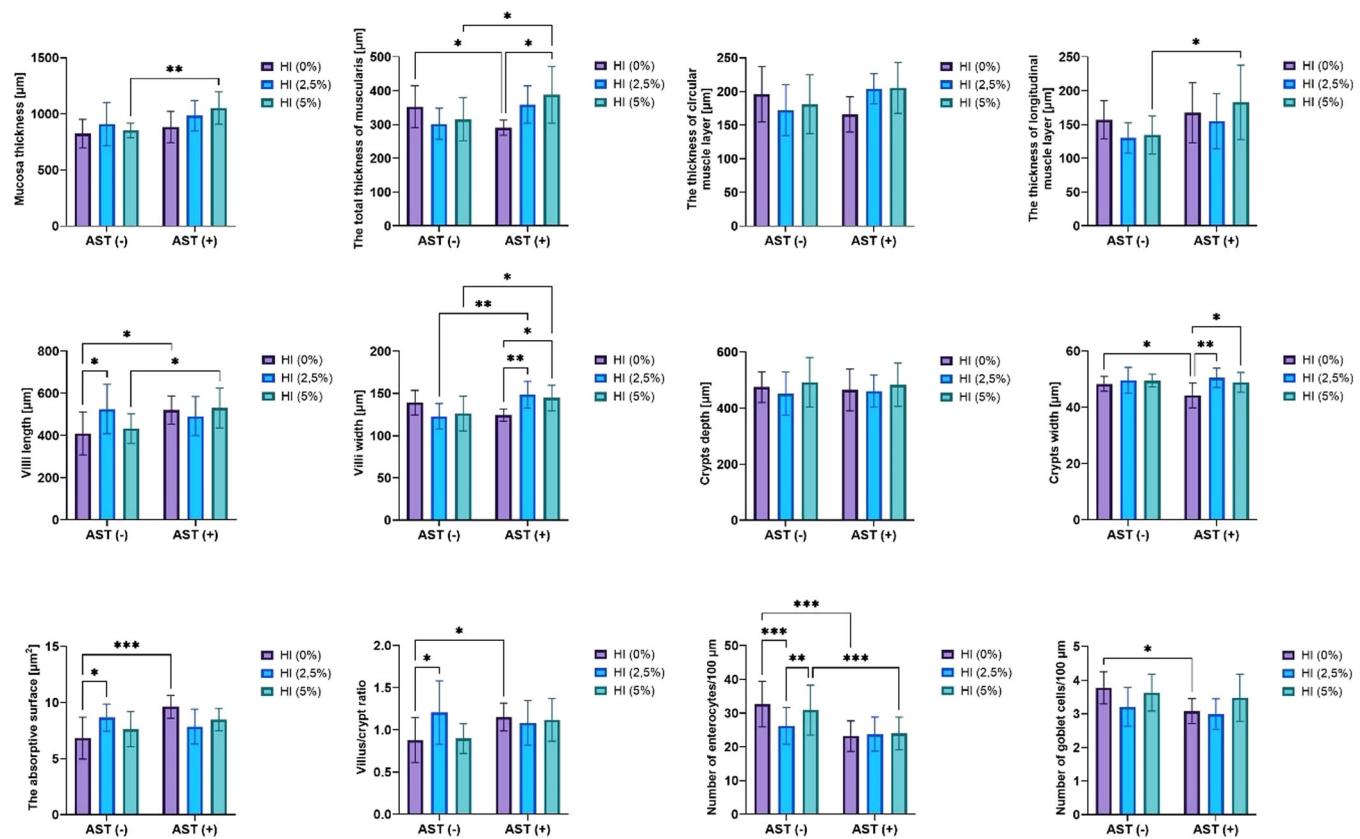


FIGURE 2 Effect of feed supplementation on jejunum structure. AST, astaxanthin (-) without and (+) with supplementation; HI, *Hermetia illucens* with percentages. Villus/crypt ratio: ratio of villus length to crypt depth. Columns represent means, and whiskers represent standard deviations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

the 2.5% HI group ($p < 0.001$) and the group without supplementation ($p < 0.05$). Conversely, a higher number of enterocytes was observed in the 5% HI + AST group than in both the 5% HI group without AST ($p < 0.001$) and the 2.5% HI + AST group ($p < 0.01$). Additionally, more enterocytes were counted in the 2.5% HI group than in the 2.5% HI + AST group ($p < 0.001$). The combination of 2.5% HI and AST significantly enhances various morphological characteristics of the ileum, such as muscularis thickness, circular muscle layer and villi dimensions, compared to either supplement alone. This suggests a synergistic effect when AST is combined with HI, particularly at the 2.5% dosage. No significant differences were observed in the mucosal width, crypt width or goblet cell count per 100 μm (Figure 3).

3.2 | IHC

The number of proliferating cells in the crypts of each intestinal segment is shown in Figure 4. The ratio of positive cells (positive by immunohistochemical staining) to negative cells was calculated. In the duodenum and jejunum, there was an obvious effect on the level of cell proliferation in the crypts at 2.5% HI meal. No significant differences were shown in the ileum. In the duodenum, a significantly higher ratio of positive Ki-67-labelled cells to negative cells was

found in the 2.5% HI group compared to the 5% HI ($p < 0.001$), 2.5% HI + AST ($p < 0.001$) and no supplementation (for all $p < 0.001$) groups. Moreover, the 2.5% HI + AST group exhibited a higher ratio compared to the groups with AST alone ($p < 0.001$) and the 5% HI + AST group (for all $p < 0.001$). In the jejunum, a significantly higher ratio of positive to negative cells was observed in the 2.5% HI + AST group than in the 5% HI + AST ($p < 0.01$) and 2.5% HI ($p < 0.001$) groups. Additionally, the AST alone group exhibited a higher ratio compared to the non-supplemented group ($p < 0.001$) and the 5% HI + AST group ($p < 0.01$). No significant differences were shown in the ileum. Thus, there is a noticeable interaction, especially between 2.5% HI and AST, on the number of proliferating cells.

TJ protein expression analysis revealed that the highest levels were in the non-additive group (Figure 5). Claudin 1 expression was higher in the no-additive group than in the 2.5% HI ($p < 0.001$), 5% HI ($p < 0.05$) and AST alone ($p < 0.001$) groups. In contrast, the 5% HI group showed a higher expression than the 2.5% HI group ($p < 0.05$). A lower expression was observed in the AST alone group than in the 5% HI + AST ($p < 0.01$) and 2.5% HI + AST groups ($p < 0.001$). Claudin 5 expression was significantly higher in the no-additive group than in the 2.5% HI ($p < 0.01$), 5% HI ($p < 0.001$) and AST alone ($p < 0.01$) groups. Moreover, expression levels were higher in the 2.5% HI + AST group than in the 2.5% HI group

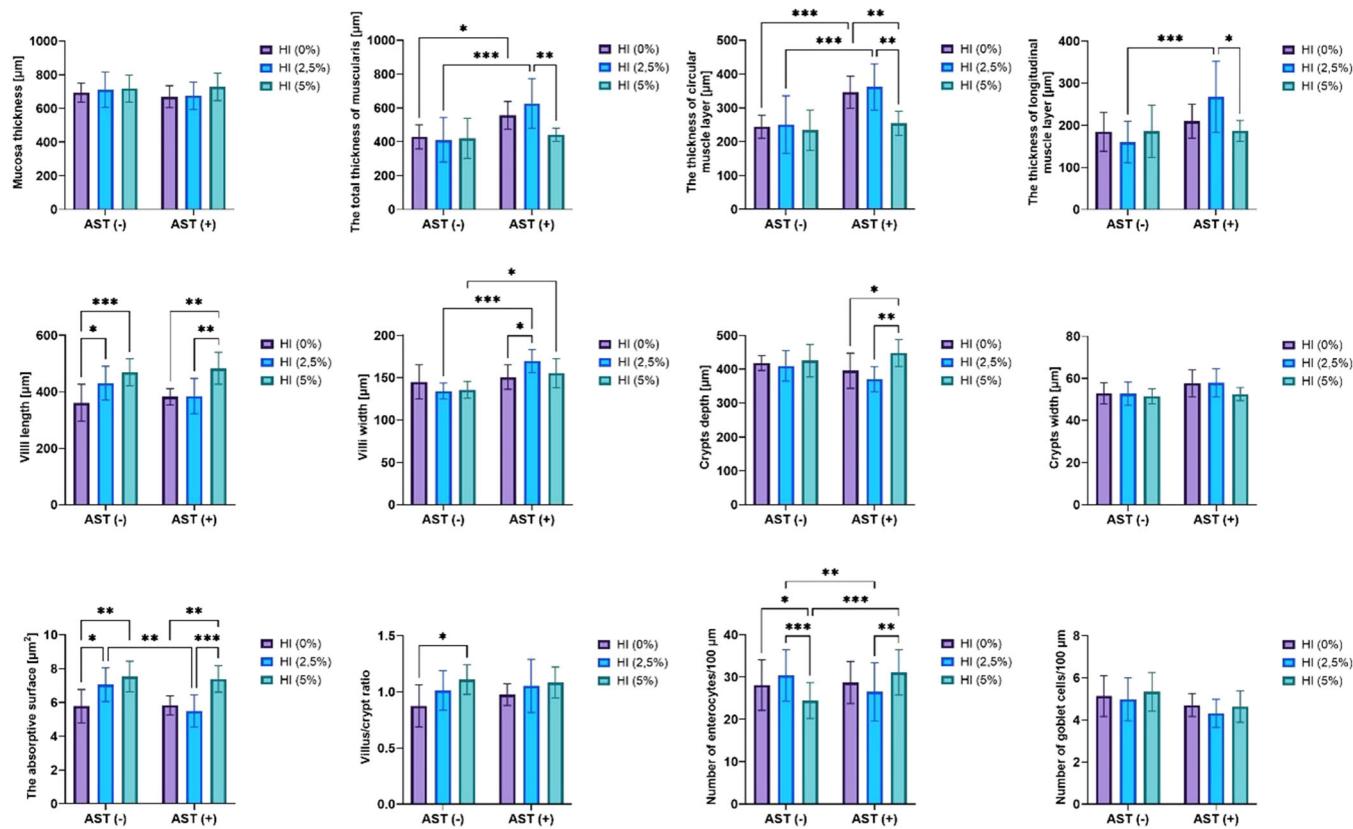


FIGURE 3 Effect of feed supplementation on ileum structure. AST, astaxanthin (-) without and (+) with supplementation; HI, *Hermetia illucens* with percentages. Villus/crypt ratio: ratio of villus length to crypt depth. Columns represent means, and whiskers represent standard deviations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

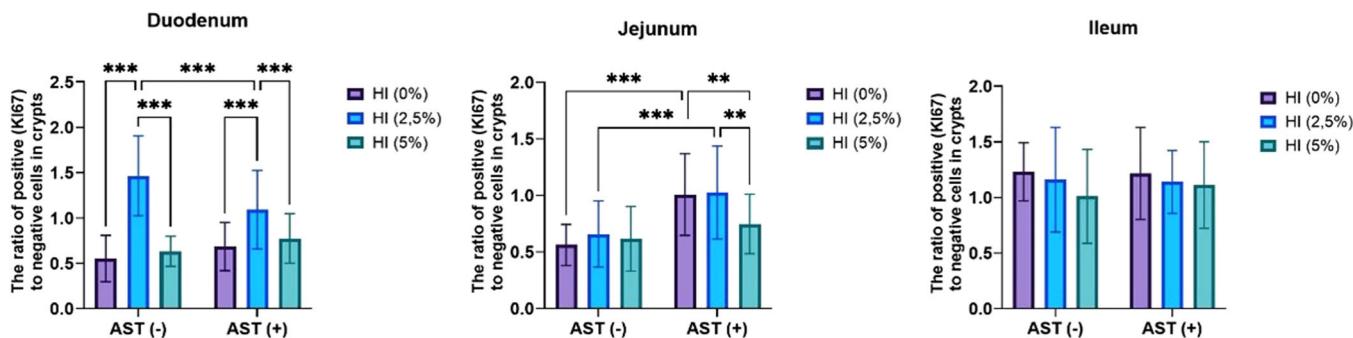


FIGURE 4 Effect of feed supplementation on cell proliferation. AST, astaxanthin (-) without and (+) with supplementation; HI, *Hermetia illucens* with percentages. Columns represent means, and whiskers represent standard deviations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

($p < 0.05$), and in the 5% HI + AST group than in the 5% HI group ($p < 0.05$). In the case of occludin, the addition of AST reduced the protein expression. Occludin expression was significantly higher in the no-additive group than in the 2.5% HI ($p < 0.001$), 5% HI ($p < 0.001$) and AST alone ($p < 0.001$) groups. The 2.5% HI group showed higher expression than the 2.5% HI + AST group, the 5% HI group showed higher expression than the 5% HI + AST group ($p < 0.001$), and the 2.5% HI + AST group showed higher expression than the group with AST alone ($p < 0.05$). Occludin exhibited

significantly higher expression in the no-additive group than in the 2.5% HI, 5% HI and AST alone groups (all $p < 0.001$).

4 | DISCUSSION

Postweaning stress affects the health and behaviour of pigs. Weaning is one of the most stressful periods, and it causes many changes in the immune and digestive systems. The main stressors during this

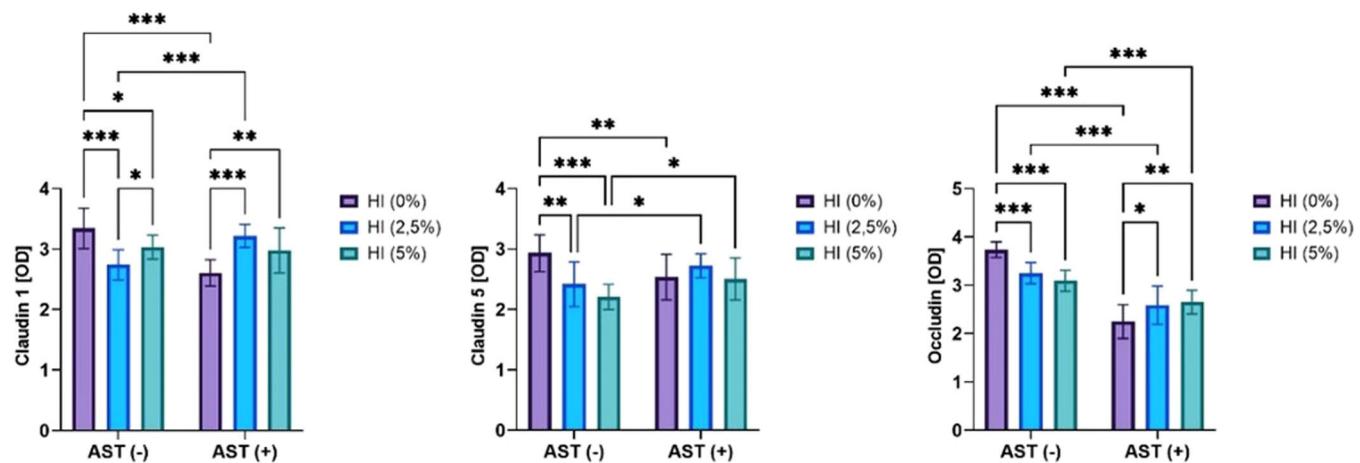


FIGURE 5 Effect of feed supplementation on intestinal barrier. AST, astaxanthin (-) without and (+) with supplementation; HI, *Hermetia illucens* with percentages. Columns represent means, and whiskers represent standard deviations. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

period are separation from the mother, a new environment, changes in feed, social hierarchy stress, mixing with pigs from other litters and increased exposure to pathogens and food or environmental antigens (Campbell et al., 2013). Considering the weaning procedure, the focus was on feed additives that could support piglet health during this period. The goal was to reduce the negative impact of weaning on the health and subsequent productivity of animals. The role of AST in reducing inflammation and oxidative damage has been well-documented in other animal models, suggesting that similar pathways may be involved in weaned piglets (Lee et al., 2022). This is consistent with the findings of this study, which showed increased enterocyte proliferation and improved intestinal morphology. On the other hand, global studies have shown positive effects of insect proteins on intestinal health and nutrient absorption (Yu et al., 2020), which is also consistent with the results discussed here.

4.1 | Histomorphometry of the intestine

The mammalian intestine consists of proliferating crypts containing intestinal stem cells and villi containing differentiated, specialized cell types. The intestine is covered by a single layer of epithelial cells that have the capacity for rapid and continuous proliferation, and the cells renew themselves every 4–5 days (Van Der Flier & Clevers, 2009; Qi & Chen, 2015). The diversity of cells found in the intestines is related to the vastness of this organ's function. Stem cells in the villi produce proliferating transit cells that eventually differentiate into four differentiated cell types, including one type of lymph cell (enterocytes) and three types of secretory cell lines: enteroendocrine cells, goblet cells and Paneth cells (Cheng & Leblond, 1974). Paneth cells migrate to the base of the crypts, whereas enteroendocrine and goblet cells migrate to the apical part of the villi (Van Der Flier & Clevers, 2009). Studies have shown that early weaning affects the expression of proteins involved in energy production in enterocytes

(which make up the vast majority of cells that build the intestinal mucosal epithelium) along the intestinal crypt-villus axis, which hinders their efficient proliferation (Xiong et al., 2015). The goblet cells and mucus secreted by these cells are the first line of defence against pathogens entering the gastrointestinal tract. The number of goblet cells in the intestine decreases during weaning (Xiong et al., 2015). *H. illucens* larvae meal appears to be a good nutritional component because of its good amino acid composition of easily digestible protein, favourable fatty acid composition (led by lauric acid), antibacterial peptides and chitin, which are both fibre and prebiotic (Wang & Shelomi, 2017; Xiong et al., 2019). The described experiment used two dietary factors: full-fat HI larvae meal at 2.5% and 5% levels, and the strong antioxidant AST. Based on these results, a strong interaction between these factors was observed. Therefore, when discussing results, it is necessary to consider them together and separately. In this experiment, pigs receiving a 5% HI larval meal had significantly longer ileum villi. The villus length-to-crypt depth ratio in the ileum was greater in both meal-treated groups, similar to the findings of Jin et al. (2021). Their study showed that longer villi and a higher ratio of villus length to crypt depth in the ileum were observed in groups treated with 4% and 8% HI supplementation. Increased villi height and the ratio of villi height to crypt depth serve as valuable assessment criteria, indicating enhanced nutrient absorption (Pluske, 2013). Therefore, an increase in villi height following supplementation may improve digestibility and nutrient absorption in weaned piglets. Tang et al. (2022) found that weaned piglets fed HI larvae meal had increased jejunum villus height and a higher villus height to crypt depth ratio, along with decreased crypt depth and more goblet cells in the jejunum. In this study, the addition of a meal increased the width of crypts in the jejunum. In the jejunum and ileum, HI supplementation did not affect the number of goblet cells per 100 μm villus length. However, the addition of 2.5% insect meal increased the number of goblet cells in the duodenum. Changes in the architecture of the villi and crypts in



response to the animal's diet can affect the number of goblet cells. The number and secretion of mucins also depend on commensal and pathogenic bacteria (Brown et al., 2006). Goblet cells are the first line of defence, so their increase could potentially suggest adaptation of the first intestinal tract to the administered supplement. The increase in goblet cell numbers following the administration of HI meal may be attributed to chitin and fatty acids present in the meal, which stimulate goblet cell proliferation. A study by Yu et al. (2020) also confirmed an increase in villi length in the jejunum of weaned piglets because of the inclusion of HI larvae meal in the feed at a level of 2%. The beneficial effect of full-fat HI larval meal was shown by Phaengphairee et al. (2023). Pigs fed the HI diet had longer duodenal villi, a higher ratio of villus height to crypt depth and a shorter crypt depth. In contrast, a study by Spranghers et al. (2018) showed that the addition of full-fat (4% and 8%) and defatted (5.4%) HI prepupae did not affect villi length, crypt depth or the ratio of villi length to width of the proximal and distal parts of the jejunum. Changes in duodenal histomorphometry in pigs kept in poor sanitary conditions under the influence of supplementation with full-fat HI larval meal at concentrations of 6% and 12% were demonstrated by Boontiam et al. (2022). The researchers showed that the inclusion of the HI diet led to villus elongation and decreased crypt depth. Adding 6% meal increased the ratio of villi length to crypt depth. No changes were observed in the jejunum or the ileum. The 2.5% HI meal affected the level, length and width of villi in the duodenum, with the highest ratio observed in the group receiving the 2.5% HI meal with AST. Improvement in intestinal morphometric parameters with AST treatment was evident. To the best of our knowledge, there are few studies on the effect of AST on the histological parameters of the intestines in pigs. However, such analyses have been performed on other animals, predominantly aquatic animals. Thus, in a study conducted on shrimp (Eldessouki et al., 2022), AST administered at concentrations of 25, 50, 100 and 200 mg/kg significantly increased villi length, villi width and absorption area, in contrast to animals not treated with AST. However, no changes were observed in the muscularis width. In this study, the total thickness of the small intestinal muscularis increased with AST supplementation. All sections of the small intestine showed the beneficial effects of AST and meals at lower levels on muscle thickness. It can, therefore, be assumed that intestinal peristalsis, contact between the contents of the intestinal lumen and mucosa, and ultimately, nutrient absorption were increased (Alshamy et al., 2018). Zhang et al. (2020) demonstrated the beneficial effects of AST on the intestinal health. Their study examined the effects of different doses of AST (30, 60 and 120 mg/kg) on the intestinal mucosal function in mice with cyclophosphamide-induced immunodeficiency. Based on these results, AST administration at 60 and 120 mg/kg BW improved the ratio of villus length to crypt width. It was also noted that the groups receiving AST had significantly longer villi in the jejunum and wider villi in the ileum. In this study, the addition of insect meal together with AST increased the villus width in the jejunum. The effect of AST on the width of crypts in the ileum was also noted; the groups receiving AST had wider crypts. It was also noted that the

addition of AST led to a deepening of the duodenal crypts. The beneficial effects of AST were demonstrated in a study conducted in an experimental necrotizing enterocolitis model using young rats (Akduman et al., 2022). Histopathological evaluation showed that the severity of intestinal damage was significantly reduced in the AST supplement group (100 mg/kg/day for four days), as well as reduced apoptosis, as determined by ELISA for caspase-3. Further evidence of the beneficial effects of AST comes from an experiment conducted in rats with cisplatin-induced gastrointestinal toxicity (Yilmaz et al., 2022). All rats were administered a single dose of cisplatin (15 mg/kg). Rats receiving (intraperitoneal) AST at a dose of 25 mg/kg showed a significant decrease in necrotic enterocytes, mucosal ulceration and inflammation in the duodenum. Animals treated with 75 mg/kg AST had normal enterocytes with visible microvilli. In the AST-treated groups, caspase-3 positivity in enterocytes was lower than that in the control animals (cisplatin alone). In the experiment presented in this manuscript, it was shown that the number of enterocytes along the villi increased in the duodenum. In addition, the beneficial effect of this supplement on the degree of cell proliferation in crypts was evident. In addition to AST, which has strong antioxidant properties, the antioxidant group includes many other substances, including vitamins, natural plant substances and transition metal ions. Zhu et al. (2012) investigated the effects of weaning stress and an antioxidant mixture on intestinal health in piglets. The antioxidant mixture included 200 mg vitamin C, 100 mg vitamin E, 450 mg tea polyphenols, 1 g lipoic acid and 5 g microbial antioxidants fermented by *Bacillus*, *Lactobacillus*, photosynthetic bacteria and beer yeast. Postweaning pigs showed reduced villi height and width and increased crypt depth in the duodenum, jejunum and ileum. Treatment with the antioxidant mixture increased villi height in the jejunum and duodenum and villi width in the jejunum and ileum compared to the weaned group (Zhu et al., 2012). These results provide further evidence of the beneficial effects of antioxidants on intestinal health. Thus, it can be suggested that the improvement in small intestinal morphology due to HI meal can be further enhanced by the antioxidant properties of AST, leading to better maintenance of the structure and function of the mucosa and intestinal muscularis.

4.2 | Surface area of absorption in the intestine

The length of the villi and the width of the crypts determine the absorptive surface area of the intestine and the absorption of nutrients. The surface area of the small intestine is a key determinant of absorptive capacity (Brun et al., 2019); therefore, its measurement provides important information on functional intestinal function. In the experiment, it was shown that both factors not only did not worsen the absorption surface area but also increased it in certain sections. AST and HI meal can improve intestinal absorption capacity by increasing the intestinal surface area through mechanisms including reduced oxidative stress, anti-inflammatory effects, nutrient delivery and prebiotic activity (MacEdo et al., 2010; Mikołajczak et al., 2023). These changes may lead to improved nutrient absorption and improved overall intestinal health.

4.3 | Immunohistochemical analysis of Ki-67 protein

Homoeostasis of the intestinal epithelium is maintained by a balance between cell proliferation in the crypt and shedding from the villus tip (Negroni et al., 2015). In the experiment, the authors used the Ki-67 protein to assess cell proliferation in the crypts of the duodenum, jejunum and ileum. In the duodenum and jejunum, the addition of 2.5% insect meal increased the number of proliferating cells. Interestingly, only increased the proliferation of AST increases only in the jejunum. Lauric acid affects cell proliferation. Zeng et al. (2022) showed that piglets supplemented with lauric acid had an increased number of proliferating cells in the crypts of the jejunum. Another study (Liu et al., 2021) showed that lauric acid improves intestinal cell proliferation and apoptosis following deoxynivalenol exposure. The redox balance of the intestinal epithelium is crucial for the function of this organ in terms of stem cell proliferation, among other things (Cao et al., 2018). Therefore, we speculated that the high ratio of proliferating cells in the jejunum is related to the antioxidant effects of AST. Its action is also noticeable at the length of the intestinal villi and entire mucosa. Thus, the antioxidant action of AST helps to maintain the redox balance necessary for intestinal cell proliferation, whereas lauric acid from insect meal directly stimulates cell proliferation.

4.4 | Immunohistochemical analysis of TJ proteins

A section of the jejunum was chosen to assess TJ proteins, as it is well known to be the section of the small intestine where most of the nutrient absorption occurs. Simple sugars, water-soluble vitamins (except for vitamin C), and amino acids are absorbed in this section of the gastrointestinal tract, whereas the rest of the food passes through the ileum (Bovera et al., 2018). Intestinal integrity is essential for digestion and nutrient absorption in piglets (Biasato et al., 2019). The intestinal epithelial barrier, composed of intercellular junctions, such as TJ, separates microorganisms and their metabolites from deeper tissues, preventing pathogenic translocation (Paradis et al., 2021). TJs connect neighbouring cells in the intestine (enterocytes), ensuring an impermeable barrier and regulating paracellular transport (Paradis et al., 2021; Shan et al., 2023). TJ integrity is influenced by various physiological factors (Livanova et al., 2023). Claudins form ion-selective paracellular pores, whereas occludin interacts with signalling proteins, affecting ERK signalling and TGF- β -induced Junctional dissociation (Paradis et al., 2021; Shan et al., 2023; Zihni et al., 2016). In a study by Zhao et al. (2023), claudin 3 expression was significantly elevated in the intestines of *Scophthalmus maximus L.* in groups treated with defatted HI meal compared to groups receiving the fish meal, with no differences in intestinal morphology. In a study on the effect of HI larvae on the expression of TJ proteins in the intestinal mucosa of weaned piglets after the administration of *Escherichia coli*, a significant increase in the mRNA expression of occludin and claudin

3 was observed in the mucosa of the jejunum in the group receiving a 4% addition of HI meal compared to the control group (without HI) (Jin et al., 2021). This contradicts the results of the present study, in which the addition of HI did not increase the expression and even decreased it. However, it should be considered that the fattening pigs were not provoked by *E. coli*, and the evaluation was performed by immunohistochemical staining, which is not quantitative but qualitative and semi-quantitative. In addition, the mRNA expression in the study by Jin et al. (2021) was examined in the entire mucosa, and the IHC analysis in the present study only examined the mucosal epithelium, which significantly reduced the area of interest. In contrast, Liu et al. (2023) observed no significant differences in the mRNA expression levels of occludin and claudin 1 in the ileum between the study groups in which soybean meal was replaced with HI larvae meal and the control group. However, a small effect of AST on the expression of TJs in the intestine was observed. TJ proteins are closely associated with the NF- κ B signalling pathway, with cytokines, such as IFN- γ and TNF- α , contributing to their downregulation. AST has been shown to reduce the expression of inflammatory factors, thereby inhibiting the activation of the NF- κ B inflammatory pathway. Consequently, AST is believed to protect the structural integrity of mucosa (Chen et al., 2021). This aligns with the findings of Wan et al. (2020), who demonstrated that AST's anti-inflammatory properties of AST restored TJ protein expression in the bovine endometrium following LPS exposure.

5 | CONCLUSIONS

Histomorphometric analyses of the small intestine showed that both *H. illucens* larvae meal (HI) and AST positively affected intestinal histological parameters, both individually and in interaction. HI meal increased the area of absorption in the jejunum and ileum, potentially increasing nutrient absorption and feed conversion. HI meal, together with AST, increased muscularity, possibly increasing intestinal peristalsis. In particular, 2.5% HI meal together with AST promoted villus elongation and improved the ratio of villus length to crypt depth. The HI meal had little effect on the number of goblet cells, whereas AST increased the number of enterocytes. Ki-67 antibody analysis showed increased cell proliferation in the duodenal and jejunal crypts, especially with the 2.5% HI meal. However, the HI meal did not increase the expression of TJ proteins, which requires further study. Based on the analyses, an interaction between AST and HI meal can be observed, especially in terms of improvement of some histological features (villus length, ratio of villus length to crypt depth and muscularis width). The most beneficial in terms of improvement of intestinal morphology was the use of both factors together: 2.5% HI meal and AST.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Kinga Szczepaniak: Conceptualization; methodology; software; validation; formal analysis; writing—original draft; writing—review and editing; visualization, project administration. **Piotr Dobrowolski:**



methodology; software; validation; formal analysis; writing—review and editing; visualization; supervision. Małgorzata Świątkiewicz: conceptualization; validation; formal analysis; investigation; data curation; writing—review and editing; visualization; supervision; project administration; funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the statutory activity of the National Research Institute of Animal Production in Poland (project number: 01-16-06-11).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data supporting the reported results are in the possession of the authors (K. S. and M. Ś.).

EDITING SOFTWARE AND LANGUAGE CORRECTION

Because the authors of this manuscript are not native English speakers, MS Word Redactor, DipL Translate (<https://www.deepl.com/translator>), Grammarly Inc. (<https://www.grammarly.com/>) and Paperpal (<https://edit.paperpal.com>), were used to correct the English spelling, grammar and style of the manuscript text.

ORCID

Kinga Szczepanik <http://orcid.org/0000-0001-5655-4019>

Małgorzata Świątkiewicz <http://orcid.org/0000-0001-7788-7509>

REFERENCES

- Akduman, H., Tayman, C., Korkmaz, V., Akduman, F., Fettah, N. D., Gürsoy, B. K., Turkmenoglu, T. T., & Çağlayan, M. (2022). Astaxanthin reduces the severity of intestinal damage in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *American Journal of Perinatology*, 39(16), 1820–1827. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1727156>
- Alshamy, Z., Richardson, K. C., Hünigen, H., Hafez, H. M., Plendl, J., & Al Masri, S. (2018). Comparison of the gastrointestinal tract of a dual-purpose to a broiler chicken line: A qualitative and quantitative macroscopic and microscopic study. *PLoS One*, 13(10), e0204921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204921>
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). (2009). *Official methods of analysis of AOAC International* (18th ed.). AOAC International.
- Biasato, I., Renna, M., Gai, F., Dabbou, S., Meneguz, M., Perona, G., Martinez, S., Lajusticia, A. C. B., Bergagna, S., Sardi, L., Capuccio, M. T., Bressan, E., Dama, A., Schiavone, A., & Gasco, L. (2019). Partially defatted black soldier fly larva meal inclusion in piglet diets: Effects on the growth performance, nutrient digestibility, blood profile, gut morphology and histological features. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10, 12. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0325-x>
- Boontiam, W., Phaengphairee, P., Hong, J., & Kim, Y. Y. (2022). Full-fatted *Hermetia illucens* larva as a protein alternative: Effects on weaning pig growth performance, gut health, and antioxidant status under poor sanitary conditions. *Journal of Applied Animal Research*, 50(1), 732–739. <https://doi.org/10.1080/09712119.2022.2147185>
- Bovera, F., Loponte, R., Pero, M. E., Cutrignelli, M. I., Calabrò, S., Musco, N., Vassalotti, G., Panettieri, V., Lombardi, P., Piccolo, G., Di Meo, C., Siddi, G., Fliegerova, K., & Moniello, G. (2018). Laying performance, blood profiles, nutrient digestibility and inner organs traits of hens fed an insect meal from *Hermetia illucens* larvae. *Research in Veterinary Science*, 120, 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.09.006>
- Brown, D. C., Maxwell, C. V., Erf, G. F., Davis, M. E., Singh, S., & Johnson, Z. B. (2006). The influence of different management systems and age on intestinal morphology, immune cell numbers and mucin production from goblet cells in post-weaning pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111(3–4), 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.12.006>
- Brun, A., Fernández Marinone, G., Price, E. R., Nell, L. A., Simões, B. M. V., Castellar, A., Gontero-Fourcade, M., Cruz-Neto, A. P., Karasov, W. H., & Caviedes-Vidal, E. (2019). Morphological bases for intestinal paracellular absorption in bats and rodents. *Journal of Morphology*, 280(9), 1359–1369. <https://doi.org/10.1002/jmor.21037>
- Campbell, J. M., Crenshaw, J. D., & Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 19. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-19>
- Cao, S. T., Wang, C. C., Wu, H., Zhang, Q. H., Jiao, L. F., & Hu, C. H. (2018). Weaning disrupts intestinal antioxidant status, impairs intestinal barrier and mitochondrial function, and triggers mitophagy in piglets. *Journal of Animal Science*, 96(3), 1073–1083. <https://doi.org/10.1093/jas/skx062>
- Cheng, H., & Leblond, C. P. (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *American Journal of Anatomy*, 141(4), 537–561. <https://doi.org/10.1002/aja.1001410407>
- Chen, Y., Zhao, S., Jiao, D., Yao, B., Yang, S., Li, P., & Long, M. (2021). Astaxanthin alleviates ochratoxin A-induced cecum injury and inflammation in mice by regulating the diversity of cecal microbiota and TLR4/MyD88/NF-κB signaling pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021(1), 8894491. <https://doi.org/10.1155/2021/8894491>
- Eldessouki, E. A. A., Diab, A. M., Selema, T. A. M. A., Sabry, N. M., Abotaleb, M. M., Khalil, R. H., El-Sabbagh, N., Younis, N. A., & Abdel-Tawwab, M. (2022). Dietary astaxanthin modulated the performance, gastrointestinal histology, and antioxidant and immune responses and enhanced the resistance of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture International*, 30(4), 1869–1887. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00876-w>
- Van Der Flier, L. G., & Clevers, H. (2009). Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annual Review of Physiology*, 71, 241–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163145>
- Grela, E. R., & Skomiał, J. (2020). Zalecenia żywieniowe i wartość pokarmowa pasz dla świń. Normy żywienia świń. Wyd. Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN, Jabłonna, Poland.
- Hampson, D. J. (1986). Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Research in Veterinary Science*, 40(1), 32–40. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)30482-x](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)30482-x)
- Igielska-Kalwat, J., Gościanka, J., & Nowak, I. (2015). Carotenoids as natural antioxidants. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 69, 418–428. <https://doi.org/10.5604/17322693.1148335>
- Jin, X., Yuan, B., Liu, M., Zhu, M., Zhang, X., Xie, G., Wu, W., Wang, Z., Xu, H., Lv, Y., Huang, Y., & Wang, W. (2021). Dietary *Hermetia illucens* larvae replacement alleviates diarrhea and improves intestinal barrier function in weaned piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 746224. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.746224>
- Kil, D. Y., & Stein, H. H. (2010). Board invited review: Management and feeding strategies to ameliorate the impact of removing antibiotic growth promoters from diets fed to weanling pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 90(4), 447–460. <https://doi.org/10.4141/cjas10028>

- Kisielski, K., Willis, S., Prescher, A., Klosterhalfen, B., & Schumpelick, V. (2002). A simple new method to calculate small intestine absorptive surface in the rat. *Clinical and Experimental Medicine*, 2, 131–135. <https://doi.org/10.1007/s102380200018>
- Lallès, J. P., Bosi, P., Smidt, H., & Stokes, C. R. (2007). Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*, 66(2), 260–268. <https://doi.org/10.1017/S0029665107005484>
- Lee, J., Kim, M. H., & Kim, H. (2022). Anti-oxidant and anti-inflammatory effects of astaxanthin on gastrointestinal diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(24), 15471. <https://doi.org/10.3390/ijms232415471>
- Liu, S., Wang, J., Li, L., Duan, Y., Zhang, X., Wang, T., Zang, J., Piao, X., Ma, Y., & Li, D. (2023). Endogenous chitinase might lead to differences in growth performance and intestinal health of piglets fed different levels of black soldier fly larva meal. *Animal Nutrition*, 14, 411–424. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.05.008>
- Liu, Z., Xie, W., Zan, G., Gao, C., Yan, H., Zhou, J., & Wang, X. (2021). Lauric acid alleviates deoxynivalenol-induced intestinal stem cell damage by potentiating the Akt/mTORC1/S6K1 signaling axis. *Chemico-Biological Interactions*, 348, 109640. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109640>
- Livanova, A. A., Fedorova, A. A., Zavirsky, A. V., Krivoi, I. I., & Markov, A. G. (2023). Dose- and segment-dependent disturbance of rat gut by ionizing radiation: Impact of tight junction proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1753. <https://doi.org/10.3390/ijms24021753>
- Lu, S., Taethaisong, N., Meethip, W., Surakhunthod, J., Sinpru, B., Sroichak, T., Archa, P., Thongpea, S., Paengkoum, S., Purba, R. A. P., & Paengkoum, P. (2022). Nutritional composition of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) and its potential uses as alternative protein sources in animal diets: A review. *Insects*, 13(9), 831. <https://doi.org/10.3390/insects13090831>
- MacEdo, R. C., Bolin, A. P., Marin, D. P., & Otton, R. (2010). Astaxanthin addition improves human neutrophils function: In vitro study. *European Journal of Nutrition*, 49, 447–457. <https://doi.org/10.1007/s00394-010-0103-1>
- Mikołajczak, Z., Mazurkiewicz, J., Rawski, M., Kierończyk, B., Józefiak, A., Świątkiewicz, S., & Józefiak, D. (2023). Black soldier fly full-fat meal in Atlantic salmon nutrition: Part A: Effects on growth performance, feed utilization, selected nutriphysiological traits and production sustainability in fries. *Annals of Animal Science*, 23(1), 225–238. <https://doi.org/10.2478/aoas-2022-0071>
- Negroni, A., Cucchiara, S., & Stronati, L. (2015). Apoptosis, necrosis, and necroptosis in the gut and intestinal homeostasis. *Mediators of Inflammation*, 2015, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2015/250762>
- Paradis, T., Bègue, H., Basmaciyan, L., Dalle, F., & Bon, F. (2021). Tight junctions as a key for pathogens invasion in intestinal epithelial cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2506. <https://doi.org/10.3390/ijms22052506>
- Pettigrew, J. E. (2006). Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: Dietary tools, part 1. *Animal Biotechnology*, 17(2), 207–215. <https://doi.org/10.1080/10495390600956946>
- Phaengphairee, P., Boontiam, W., Wealleans, A., Hong, J., & Kim, Y. Y. (2023). Dietary supplementation with full-fat *Hermetia illucens* larvae and multi-probiotics, as a substitute for antibiotics, improves the growth performance, gut health, and antioxidative capacity of weaned pigs. *BMC Veterinary Research*, 19(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03550-8>
- Pluske, J. R. (2013). Feed-and feed additives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4, 1–7. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-1>
- Pluske, J. R., Hampson, D. J., & Williams, I. H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: A review. *Livestock Production Science*, 51(1–3), 215–236. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(97\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(97)00057-2)
- Qi, Z., & Chen, Y. G. (2015). Regulation of intestinal stem cell fate specification. *Science China Life Sciences*, 58, 570–578. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4859-7>
- Rimoldi, S., Di Rosa, A. R., Oteri, M., Chiofalo, B., Hasan, I., Saroglia, M., & Terova, G. (2024). The impact of diets containing *Hermetia illucens* meal on the growth, intestinal health, and microbiota of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 50, 1003–1024. <https://doi.org/10.1007/s10695-024-01314-9>
- Schiavone, A., De Marco, M., Martínez, S., Dabbou, S., Renna, M., Madrid, J., Hernandez, F., Rotolo, L., Costa, P., Gai, F., & Gasco, L. (2017). Nutritional value of a partially defatted and a highly defatted black soldier fly larvae (*Hermetia illucens* L.) meal for broiler chickens: Apparent nutrient digestibility, apparent metabolizable energy and apparent ileal amino acid digestibility. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 51. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0181-5>
- Seyed Jafari, S. M., & Hunger, R. E. (2017). IHC optical density score: A new practical method for quantitative immunohistochemistry image analysis. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 25(1), e12–e13. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000370>
- Shan, T., Yan, J., Zhang, X., & Chen, Y. (2023). In vitro and in vivo evaluation of effects of high-purity magnesium on tight junction of intestinal epithelial cell. *Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials*, 21, 228080002311652.
- Spranghers, T., Michiels, J., Vrancx, J., Ovyn, A., Eeckhout, M., De Clercq, P., & De Smet, S. (2018). Gut antimicrobial effects and nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) prepupae for weaned piglets. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.08.012>
- Stelios, V., Ilias, G., Ioannis, P., Christos, A., Elias, P., & Paschalidis, F. (2024). Effect of three different insect larvae on growth performance and antioxidant activity of thigh, breast, and liver tissues of chickens reared under mild heat stress. *Tropical Animal Health and Production*, 56(2), 80. <https://doi.org/10.1007/s11250-024-03923-1>
- Szczepeanik, K., Furgał-Dierżuk, I., Gala, Ł., & Świątkiewicz, M. (2023). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin as feed additives on health and production indices in weaned pigs. *Animals: An Open Access Journal from MDPI*, 13, 163. <https://doi.org/10.3390/ani13010163>
- Tang, Q., Xu, E., Wang, Z., Xiao, M., Cao, S., Hu, S., Wu, Q., Xiong, Y., Jiang, Z., Wang, F., Yang, G., Wang, L., & Yi, H. (2022). Dietary *Hermetia illucens* larvae meal improves growth performance and intestinal barrier function of weaned pigs under the environment of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Frontiers in Nutrition*, 8, 812011. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.812011>
- Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R., & De, A. (2014). IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*, 9(5), e96801. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096801>
- Vega-Lopez, M. A., Telemo, E., Bailey, M., Stevens, K., & Stokes, C. R. R. (1993). Immune cell distribution in the small intestine of the pig: immunohistological evidence for an organized compartmentalization in the lamina propria. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 37(1), 49–60.
- Vogel, H., Müller, A., Heckel, D. G., Gutzeit, H., & Vilcinskas, A. (2018). Nutritional immunology: Diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Developmental & Comparative Immunology*, 78, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.09.008>
- Wan, F. C., Zhang, C., Jin, Q., Wei, C., Zhao, H. B., Zhang, X. L., You, W., Liu, X. M., Liu, G. F., Liu, Y. F., & Tan, X. W. (2020). Protective effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in bovine endometrial epithelial cells. *Biology of Reproduction*, 102(2), 339–347. <https://doi.org/10.1093/biolre/izoz187>

- Wang, Y. S., & Shelomi, M. (2017). Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods*, 6(10), 91. <https://doi.org/10.3390/foods6100091>
- Waśko, A., Bulak, P., Polak-Berecka, M., Nowak, K., Polakowski, C., & Bieganowski, A. (2016). The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.038>
- Xiong, X., Tan, B., Song, M., Ji, P., Kim, K., Yin, Y., & Liu, Y. (2019). Nutritional intervention for the intestinal development and health of weaned pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 309(4), G229–G237. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00095.2015>
- Xiong, X., Yang, H., Tan, B., Yang, C., Wu, M., Liu, G., Kim, S. W., Li, T., Li, L., Wang, J., Wu, G., & Yin, Y. (2015). Differential expression of proteins involved in energy production along the crypt-villus axis in early-weaning pig small intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 309(4), G229–G237. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00095.2015>
- Yilmaz, Y., Tumkaya, L., Mercantepe, T., & Akyildiz, K. (2022). Protective effect of astaxanthin against cisplatin-induced gastrointestinal toxicity in rats. *European Surgery*, 54, 32–38. <https://doi.org/10.1007/s10353-020-00643-2>
- Yu, M., Li, Z., Chen, W., Rong, T., Wang, G., Wang, F., & Ma, X. (2020). Evaluation of full-fat *Hermetia illucens* larvae meal as a fishmeal replacement for weanling piglets: Effects on the growth performance, apparent nutrient digestibility, blood parameters and gut morphology. *Animal Feed Science and Technology*, 264, 114431. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114431>
- Zeng, X., Yang, Y., Wang, J., Wang, Z., Li, J., Yin, Y., & Yang, H. (2022). Dietary butyrate, lauric acid and stearic acid improve gut morphology and epithelial cell turnover in weaned piglets. *Animal Nutrition*, 11, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2022.07.012>
- Zhang, L., Cao, W., Gao, Y., Yang, R., Zhang, X., Xu, J., & Tang, Q. (2020). Astaxanthin (ATX) enhances the intestinal mucosal functions in immunodeficient mice. *Food & Function*, 11(4), 3371–3381. <https://doi.org/10.1039/c9fo02555c>
- Zhao, J., Pan, J., Zhang, Z., Chen, Z., Mai, K., & Zhang, Y. (2023). Fishmeal protein replacement by defatted and full-fat black soldier fly larvae meal in juvenile turbot diet: Effects on the growth performance and intestinal microbiota. *Aquaculture Nutrition*, 2023, 8128141. <https://doi.org/10.1155/2023/8128141>
- Zhu, L. H., Zhao, K. L., Chen, X. L., & Xu, J. X. (2012). Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. *Journal of Animal Science*, 90(8), 2581–2589. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4444>
- Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(9), 564–580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Szczepanik, K., Dobrowolski, P., & Świątkiewicz, M. (2024). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin on intestinal histology and expression of tight junction proteins in weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 108, 1820–1832. <https://doi.org/10.1111/jpn.14024>

Article

The Protective Effects of Astaxanthin (AST) in the Liver of Weaned Piglets

Kinga Szczepanik ¹, Maria Oczkowicz ^{2,*}, Piotr Dobrowolski ³ and Małgorzata Świątkiewicz ¹

¹ Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, Krakowska St. 1, 32-083 Balice, Poland; kinga.szczepanik@iz.edu.pl (K.S.); malgorzata.swiatkiewicz@iz.edu.pl (M.Ś.)

² Department of Animal Molecular Biology, National Research Institute of Animal Production, Krakowska St. 1, 32-083 Balice, Poland

³ Department of Functional Anatomy and Cytobiology, Maria Curie-Skłodowska University, Akademicka St. 19, 20-033 Lublin, Poland; piotr.dobrowolski@umcs.lublin.pl

* Correspondence: maria.oczkowicz@iz.edu.pl

Simple Summary: Weaning is a period when young animals are exposed to a number of stressors caused by the separation from the sow, transport and handling, different food sources, a new social hierarchy, and different physical environments. This situation contributes to the generation of free radicals that cause oxidative stress. In weaned piglets, the most prominent disorders occur in the intestines, and their increased permeability can compromise liver function as metabolites migrate to the liver. Oxidative stress can lead to liver necrosis. Astaxanthin (AST) is a powerful carotenoid and antioxidant that can scavenge free radicals and protect cells from oxidative damage. Findings show that AST has a protective effect on the liver, reducing inflammation, lipid accumulation and markers of liver damage. It also inhibits insulin resistance and lipotoxicity-induced steatohepatitis and regulates fatty acid metabolism pathways. This study investigated the liver-protective properties of AST in weaned piglets. The study showed that AST reduces collagen content in liver tissue and affects the expression of specific genes related to liver function. Expression of CREB, NOTCH1 and NR1H3 genes decreased, while expression of the CYP7A1 gene increased. These findings underscore the beneficial effects of AST on liver health and suggest its potential as a protective agent against liver damage.



Citation: Szczepanik, K.; Oczkowicz, M.; Dobrowolski, P.; Świątkiewicz, M. The Protective Effects of Astaxanthin (AST) in the Liver of Weaned Piglets. *Animals* **2023**, *13*, 3268. <https://doi.org/10.3390/ani13203268>

Academic Editor: Clive J. C. Phillips

Received: 23 June 2023

Revised: 17 October 2023

Accepted: 18 October 2023

Published: 19 October 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: During the weaning period, piglets are exposed to high levels of stress, which often causes problems with the digestive system. This stress also promotes the production of free radicals, resulting in oxidative stress. Astaxanthin (AST) stands out as one of the most potent antioxidants. Its resistance to light and heat makes it particularly valuable in compound feed production. This study was to determine the effect of AST impact on liver histology and gene expression in piglets. For our experiment, we used 16 weaned piglets of the PL breed, which we divided into two groups: Group I (control group with no AST supplementation) and Group II (supplemented with AST at 0.025 g/kg). Both feed mixtures were iso-proteins and iso-energetic, meeting the nutritional requirements of the piglets. The experiment lasted from day 35 to day 70 of the piglets' age, during which they had ad libitum access. The results indicate that the addition of AST prevents liver fibrosis due to reduced collagen deposition in the tissue. Analysis of gene expression supported these results. In the AST-supplemented group, we noted a decrease in NR1H3 expression, an increase in CYP7A1 expression, and reductions in the expression of NOTCH1 and CREB genes.

Keywords: astaxanthin; pigs; weaned; liver; oxidative stress; collagen

1. Introduction

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy-β,β-carotene-4,4'-dione) belongs to the xanthophyll carotenoid group [1]. It is found in marine organisms such as shrimps, crabs, fish, and algae, and

is also found in yeast and bird feathers [2]. It is characterized by its properties such as antioxidant, anti-inflammatory and anticancer abilities [1,3]. Acting as a potent antioxidant, astaxanthin serves as a free radical scavenger and reactive oxygen species (ROS) quencher, thereby protecting molecules and cellular membranes from oxidative damage [4,5]. Free radicals are formed either by both normal cellular metabolism and external sources like pollutants, radiation, and drugs. When there is an inability to gradually destroy excess free radicals, their accumulation in the body leads to the formation of oxidative stress [6]. Oxidative stress plays a role in the pathogenesis of many diseases associated with liver damage [1]. The liver, being the largest gland, performs detoxification, metabolic, filtration and storage functions. According to studies, oxidative stress mediates the progression of fibrosis, and molecules associated with oxidative stress can also act as mediators for molecular and cellular events associated with liver fibrosis [7]. Stellate cells (HSC), primarily responsible for liver fibrosis, along with Kupffer cells and attracted mononuclear cells, play significant roles in this process [7,8]. The interactions are controlled and induced by chemical mediators, among which transforming growth factor β (TGF- β) plays a special role. TGF- β expression and synthesis are modulated mainly by redox reactions [9]. One of the main pathways underlying fibrogenesis in the liver is the activation of HSC due to organ damage. During activation, HSC transforms from resting to proliferating and contracting myofibroblast-like cells and produces type I collagen, which is one of the main components of the extracellular matrix [10–12]. Oxidative radicals, by impairing mitochondrial function, can instigate hepatocyte death through various means, such as oncotic necrosis, necroptosis, and apoptosis, and promote the secretion of proinflammatory mediators [13]. Consequently, ROS are believed to potentially foster fibrosis by damaging hepatocytes or by activating Kupffer cells and HSC [10,14].

Scientific reports suggest a protective effect of AST on the liver. In a study by Sila et al. [15], the potential of astaxanthin to counteract diabetic complications was explored in adult rats. The results underscored its capability to reverse hepatotoxicity. Liu et al. [2] showed an effect of AST on the intestinal microflora of mice. Their study revealed that AST notably attenuated inflammation and reduced excessive lipid accumulation and serum markers of liver damage. Another study showed that this carotenoid inhibited and reversed mouse lipotoxicity-induced insulin resistance and steatohepatitis, attributed to the reduction in hepatic lipid accumulation and oxidation [16]. Zhang et al. [17] further cemented AST's hepatoprotective effects through their experiments on Wistar rats exposed to arsenic exposure. AST treatment attenuated liver damage induced by long-term arsenic exposure reduced the increase in inflammatory cytokines like NF- κ B, tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β , as well as lowered oxidative stress levels and overall arsenic content in the liver. In an experiment by Jia et al. [18], AST was shown to have a beneficial effect on hepatic steatosis. The research established that astaxanthin elevates PPAR (both PPAR α and PPAR γ) levels and impedes the Akt-mTOR pathway, subsequently influencing lipid metabolism in the liver [18].

In young piglets during the weaning period, the most described health problems are due to intestinal dysfunction. They result from impaired nutrient absorption caused by, among other things, atrophy of the intestinal villi and an abnormal ratio of villi length to crypt depth [19]. Little attention during this period is focused on the liver, which is extremely susceptible to oxidative stress. In addition, blood reaches the liver from the intestines through the portal vein; thus, when the intestinal function is disrupted, increased intestinal permeability can contribute to the translocation of metabolites to the liver and impaired liver function [20]. A large amount of oxygen is consumed in the liver, which is related to the presence of numerous mitochondria. This, in turn, is associated with the formation of ROS. Mitochondria metabolize about 80–90% of the oxygen used by hepatocytes and 2% of the oxygen consumed is converted to superoxide anions [21,22]. However, despite the liver's susceptibility to various stress forms, there is a noticeable research gap regarding liver dysfunction resulting from oxidative stress in weaned piglets [23].

Our study was designed to assess the impact of AST on the liver health of weaned piglets, both histologically and genomically. Building on the findings of Szczepanik et al. [24] that confirmed the beneficial effects of AST on liver panel biochemistry and blood morphology in weaned pigs, the present study was extended to analyze the protective effect of AST supplementation on piglet livers. Our hypothesis postulated that AST, given its potent antioxidant properties, would reduce oxidative stress, consequently shielding the liver from excessive collagen deposition amidst liver lobules. This, in turn, would prevent possible pathological fibrosis. For gene expression analyses, we selected genes for encoding receptor proteins (*NOTCH1*), genes that are regulators of key liver functions, such as fatty acid metabolism (*ACAA2*, *CYP7A1*), lipids (*NR1H3*), sugars (*HK1*), cholesterol metabolism (*SREBF2*, *APOE*, *DHCR24*), mitochondrial mechanisms (*SIRT3*), and exogenous chemical metabolism (*CYP1A1*). Additionally, our analysis encompassed genes either directly or indirectly related to extracellular matrix deposition (*CREB1*, *COL1A2*), immune reactions (*CXCL10*) and antioxidant protection (*SOD1*, *CAT*). Histopathological analysis, in turn, allowed us to assess the percentage of collagen in the tissue and predict the antifibrotic effect of AST.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Approval

All experimental procedures involving live animals in this study were conducted in strict accordance with the guidelines set forth by the first Local Ethics Committee for Experiments with Animals in Cracow, Poland (Resolution No. 420/2020, dated 22 July 2020). During the experimental period, the health of the postweaning pigs was regularly monitored by a veterinarian.

2.2. Animals

The experiment was conducted on sixteen 35-day-old postweaning barrows of the Polish Landrace (PL) breed, each weighing approximately 8.7 kg (± 0.2 kg). These pigs were divided into two distinct groups, with each group containing eight pigs. Group I served as the control, while Group II received astaxanthin supplementation. The source of astaxanthin was *Haematococcus pluvialis* (Podkowa AD 1905 sp. z o.o., Lublin, Poland), and was added in the amount of 0.025 g/1 kg (25 mg/kg) of feed mixture. It is noteworthy that AST has not yet been recognized in pig nutrition, resulting in a limited number of studies in this area. The dose of AST for the piglet feed in our experiment was determined by referencing a few existing piglet studies [25]. Furthermore, we considered the observed higher antioxidant activity of AST when compared to vitamin E [26,27], an antioxidant routinely incorporated into pig feeds. All the pigs were given a diet that was both iso-protein and iso-energetic, adhering to the nutritional standards set by the Polish standards of pig feeding [28]. Table 1 presents a detailed breakdown of the diets' ingredient composition and basic chemical analyses of feed mixture samples were performed according to standard methods [29].

The experimental fattening phase lasted 35 days. During this period, the pigs were housed individually in pens, each fitted with a self-feeder and nipple waterers providing ad libitum access to feed and water. The pigs were kept in a mechanically ventilated room, maintaining a temperature of 18–20 °C. However, during the initial acclimatization phase, heating lamps were utilized to elevate the surrounding temperature to approximately 28 °C. The room's air humidity averaged around 55%, with an air exchange of 15 × /h, and a natural day/night light cycle was maintained. The pigs were kept in individual pens and received feed and water ad libitum. At the end of the experiment, all pigs were slaughtered. The animals were killed with an approved standard method by simply stunning them with a specialized penetrating pin device Blitz (Bad Neustadt, Germany) designed for slaughtering pigs and severing the blood vessels of the throat. Immediately after the animals' slaughter, their liver was collected. A fragment of liver tissue (from the right lobe) was immersed in a 4% buffered formalin solution for preservation. Another

portion from the right lobe was placed initially in liquid nitrogen and later stored in an ultra-low-temperature freezer set at -80°C .

Table 1. Ingredients (%) and nutritive value of diets in the experiment.

Items	I	II
	Control	AST
Soybean pressed cake	19	19
Wheat	42.17	42.17
Corn	20	20
Rapeseed oil	0.8	0.8
Skimmed milk powder	10	10
Dried whey	5	5
1-Ca phosphate	0.4	0.4
Feed chalk	1.15	1.15
Salt	0.13	0.13
Lysine	0.4	0.4
Methionine	0.23	0.23
Threonine	0.16	0.16
Tryptophan	0.06	0.06
Vitamin-mineral premix *	0.5	0.5
Astaxanthin (0.025 g/kg)	-	+
Content in 1 kg:		
Dry matter, g	901	901
Crude protein, g	183	183
Crude fat, g	40	40
Crude fiber, g	27	27
Crude ash, g	56	56
Metabolizable energy, MJ **	13.8	13.8
Lysine, g	13.7	13.7
Methionine + Cystine, g	8.2	8.2
Threonine, g	8.8	8.8
Tryptophan, g	2.7	2.7
Calcium, g	7.6	7.6
Phosphorus digestible, g	3.1	3.1

AST—astaxanthin; * Content in 1 kg of premix: vit A—2,400,000 IU; vit D3—400,000 IU; vit E—8000 IU; vit B1—400 mg; vit B12—6000 μg ; vit B2—1000 mg; vit B5—3000 mg; vit B6—600 mg; vit K—400 mg; biotin—30,000 μg ; niacin—5008.3 mg; folic acid—100 mg; pantothenic acid—2760 mg; choline—24,193.548 mg; betaine—12,000 mg; Cu—20,000 mg; Fe—20,000 mg; I—200 mg; Mn—8000 mg; Se—60 mg; Zn—24,000 mg; Ca—267.979 g; Cl—6.268 g; K—0.066 g; Mg—30 g; Na—0.037 g; S—22.245 g. ** Metabolizable energy calculated using the equation of Hoffmann and Schiemann [30].

2.3. Histology

A sample of liver tissue was removed from buffered formalin, cut into two fragments of about 1 cm^2 in size, and then placed in histology cassettes. These cassettes were subsequently placed in a tissue processor, where they were dehydrated through increasing alcohol concentrations (30%, 50%, 70%, 80%, 96%, 100%). They were then permeabilized with xylene and embedded in paraffin. To enhance the reliability of the results, two paraffin blocks were created from each liver sample. Two slides were produced from each block by slicing the blocks with a microtome (Microm HM 340 E, Thermo Scientific, Germany) into $4\text{ }\mu\text{m}$ sections. These liver preparations were stained using the Masson-Goldner trichrome technique with aniline blue to differentiate structures. Stained slides were viewed under a light microscope (Axio Lab. A1, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) equipped with an Axiocam color 105 camera (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). The collected microscopic images underwent examination using Zen 2.3 blue edition software (version 2.3; Carl Zeiss Microscopy, Jena, Germany) and ImageJ (version 1.53; US National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>, accessed on 15 May 2023). ImageJ software version 1.53 (US National Institutes of Health, Bethesda, MD,

USA) was used to calculate the percentage of collagen fibers (colored blue: collagen fibers), with a random selection of regions of interest (ROIs) in everyone (10 ROIs). Quantitative assessment of liver fibrosis, in this case specifically peritumoral fibrosis, depended on distinguishing colors between blue (collagen fibers) and red (parenchyma). The percentage of collagen fibers in the image was assessed using the Threshold function (after setting an 8-bit color scale) [17]. The percentage of collagen fibers was counted per area of ROI (percent fiber content per area of interest). Results were reported as averages for the individual.

2.4. RNA Isolation and Quantitative PCR (*qPCR*)

RNA isolation was conducted using the Total RNA Mini (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) in accordance with the producer's recommendations. The RNA quality was assessed using the Tapestation 2200 (Agilent, Santa Clara, CA, USA), while its quantity was measured with the Nanodrop 2200 (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). For further purification, the RNAClean XP (Beckman Coulter, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) was utilized. After purification, the RNA quality was assessed by agarose gel electrophoresis. The RNA was then reverse transcribed using the High Capacity cDNA Archive Kit (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA). Subsequently, qPCR was performed using TaqMan Gene Expression Assays (Table 2): NOTCH1 Ss03377164_u, CYP7A1 Ss03378689_u1, NR1H3 Ss03389237_g1, CREB1 Ss03386122_u1, SREBF2 Ss03376492_u1, SIRT3 Ss03386766_u1, DHCR24 Ss04323966_m1, APOE Ss03394681_m1, ACAA2 Ss04245775_m1, HK1 Ss04323446_m1, CXCL10 Ss03391845_g1, CYP1A1 Ss03394917_g1, COL1A2 Ss03375009_u1, SOD1 Ss03373476_u1, and CAT Ss04323025_m1. The process was performed in triplicate on the QuantStudio 7-flex instrument (Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) using the TaqMan Gene Expression Master Mix. For an endogenous control, RPS29 Ss03391548_g1 was used.

Table 2. TaqMan assays that were used in the study.

	Gene	Primers Sequence	Amplicon Length, bp
RPS29	ribosomal protein S29	Ss03391548_g1	71
HK1	hexokinase 1	Ss04323446_m1	59
NOTCH1	notch receptor 1	Ss03377164_u	71
CYP7A1	Cytochrome P450 family 7 subfamily A member 1	Ss03378689_u1	119
NR1H3	Nuclear receptor subfamily 1 group H member 3	Ss03389237_g1	101
CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	Ss03386122_u1	98
SREBF2	Sterol regulatory element binding transcription factor 2	Ss03376492_u1	67
SIRT3	Sirtuin 3	Ss03386766_u1	80
DHCR24	24-dehydrocholesterol reductase	Ss04323966_m1	104
APOE	Apolipoprotein E	Ss03394681_m1	63
ACAA2	Acetyl-CoA acyltransferase 2	Ss04245775_m1	71
CXCL10	C–X–C motif chemokine ligand 10	Ss03391845_g1	146
CYP1A1	Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1	Ss03394917_g1	77
COL1A2	Collagen type I alpha 2 chain	Ss03375009_u1	76
SOD1	Superoxide dismutase 1	Ss03373476_u1	77
CAT	Catalase	Ss04323025_m1	56

Gene expression data were analyzed using the nonparametric Mann–Whitney *U* test, whereas the percentage data for collagen fibers were evaluated using one-way ANOVA. All analyses were conducted using the Statistica® ver. 13.3 software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The experimental model comprised two groups: Group I (control) and Group II (with AST). Each piglet was considered an individual experimental unit ($n = 8$ pigs per group). Differences were deemed statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

The evidence showed that the piglets exhibited no signs of disease, indicating that the weaning procedure was normal and no undesirable health situations occurred during

the rearing of the piglets. In the present experiment, we checked whether AST has any protective effect on piglets after a stressful weaning procedure.

3.1. Histology

Histological analysis of liver tissues showed that the addition of AST significantly reduced ($p < 0.001$) the percentage of collagen fibers around liver lobules (Figure 1). In the control group, the typical sinusoidal vessels were not present, and there was an observed alteration in the customary polygonal shape of hepatocytes, accompanied by their swelling. Conversely, in the liver tissues from the AST-treated group, the hepatocytes retained their normal shape, and the standard structure of the sinusoidal vessels was visible.

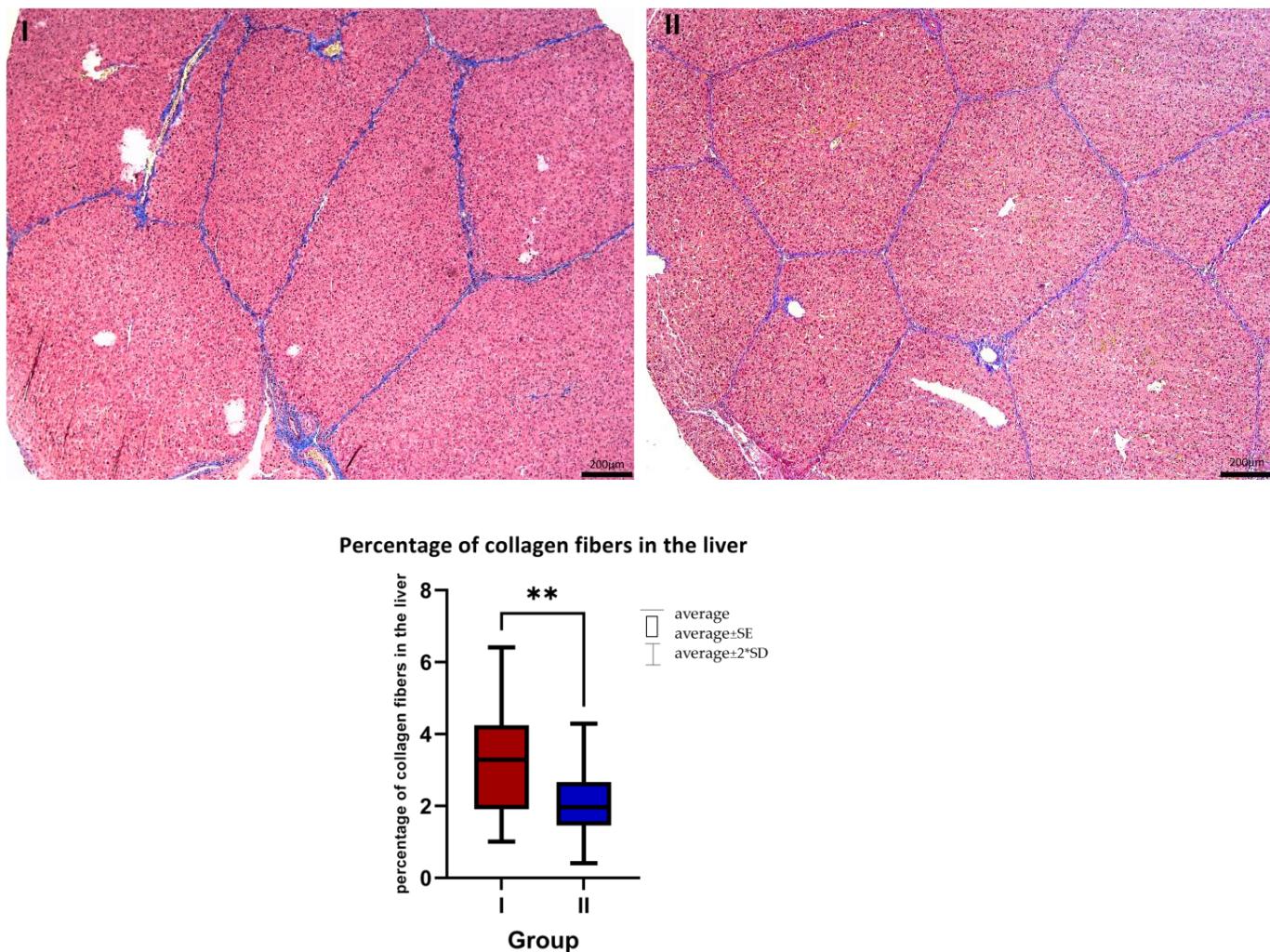


Figure 1. Masson-Goldner staining with aniline blue. I—control group, II—a group with AST addition. Magnification $5\times$. Scale bar = $200\text{ }\mu\text{m}$. The average percentage of collagen fibers in the liver in the control group (I, $n = 8$) and the AST-treated group (II, $n = 8$). Mean \pm SD (I) = $3.412 \pm 1.65\%$; mean \pm SD (II) = $2.018 \pm 1.05\%$. ** $p \leq 0.01$.

3.2. Gene Expression

Gene expression analysis showed that the addition of AST significantly increased the expression of *CYP7A1* ($p = 0.001$) and significantly reduced the expression levels of *CREB* ($p = 0.040$), *NOTCH1* ($p = 0.004$), and *NR1H3* ($p = 0.002$). However, there were no significant differences between the groups regarding the expression of *SREBF2*, *SIRT3*, *APOE*, *DHCR24*, *ACCA2*, *HK1*, *CXCL10*, *CYP1A1*, *COL1A2*, *SOD1*, and *CAT* (Table 3).

Table 3. Analysis of gene expression in group I and group II. RQ, relative quantity of mRNA in comparison to housekeeping gene.

Gene	Mean RQ ± SE		<i>p</i> -Value
	I	II	
<i>CYP7A1</i>	0.403 ± 0.07	0.927 ± 0.14	0.001
<i>SREBP2</i>	0.881 ± 0.11	0.786 ± 0.14	0.232
<i>SIRT3</i>	0.210 ± 0.05	0.395 ± 0.11	0.279
<i>APOE</i>	0.439 ± 0.11	0.564 ± 0.22	0.867
<i>CREB</i>	1.701 ± 0.32	0.807 ± 0.07	0.040
<i>NOTCH1</i>	0.433 ± 0.07	0.193 ± 0.03	0.004
<i>NR1H3</i>	0.459 ± 0.08	0.134 ± 0.05	0.002
<i>DHCR24</i>	0.268 ± 0.04	0.185 ± 0.04	0.121
<i>ACCA2</i>	0.196 ± 0.24	0.127 ± 0.13	0.878
<i>HK1</i>	1.271 ± 0.24	1.183 ± 0.14	0.959
<i>CXCL10</i>	0.205 ± 0.04	0.158 ± 0.04	0.152
<i>CYP1A1</i>	3.134 ± 1.28	6.112 ± 4.11	0.645
<i>COL2A1</i>	3.147 ± 0.50	3.053 ± 0.52	0.954
<i>SOD1</i>	1.326 ± 0.18	1.638 ± 0.23	0.382
<i>CAT</i>	2.381 ± 0.51	2.323 ± 0.34	0.878

4. Discussion

Postweaning stress is a phenomenon that affects not only the behavior but also the health status of pigs. Weaning stands out as one of the most stressful periods, resulting in intestinal, immunological, and behavioral changes. During this transitional period, piglets confront numerous stressors. These include abrupt separation from the sow, transport, and handling stress, a different food source, social hierarchy stress, mixing with pigs from other litters, a different physical environment, increased exposure to pathogens and food or environmental antigens [31]. After weaning the piglets mostly return to normal status during 10–14 days, this recovery timeline can drastically extend if they encounter issues such as diarrhea, atrophy of intestinal villi, or inflammation of the intestinal mucosa. In such instances, their recuperation is protracted, feed utilization is delayed, and animal productivity declines. This underscores the idea that the repercussions of weaning may linger far longer than the effects of a singular stressor, like immobilization stress. Given the weaning procedure, the focus has shifted towards supplementary feed additives to support the health of piglets during these difficult postweaning days. The aim is to limit the negative effects of weaning on the animals' subsequent productivity. Our task is to alleviate this transitional period as much as possible for the piglets. Our study spans 35 days and seeks to examine the effects of AST. This is examined in the context of stress induced not just by maternal separation, but related to the whole range of previously mentioned stressors.

There are limited results from detailed liver estimations. However, in the case of intensively fed and fast-growing monogastric animals, this organ is extremely loaded. The liver's condition mirrors the health of animals subjected to poor quality or improperly balanced feed. Our research introduces a novel aspect of liver analysis, encompassing both histological and genomic analysis.

4.1. Histology

The study observed a potential beneficial impact of AST on the percentage of collagen in liver tissue. The analysis demonstrated that AST significantly lowered the percentage of collagen fibers in liver sections. It is vital to note that, when assessing the histological differences between the livers of the two groups, that samples were taken after 35 days into the experiment, and during the postweaning period which also affected the structure of the organ [32]. In the group fed a standard diet, irregular sinusoidal vessels were observed, along with altered hepatocyte shapes and swelling of these cells. However, in the AST-

treated group, hepatocytes maintained their normal shape and the standard structure of sinusoidal vessels was evident.

Liver fibrosis is marked by the excessive buildup of extracellular matrix proteins, predominantly collagen [1]. It arises due to various diseases that inflict damage on hepatocytes, engage inflammatory cells, and activate collagen-producing cells [33]. A primary mechanism driving fibrogenesis in the liver involves the activation of HSCs following organ damage. Upon activation, HSC transforms from a resting state to a proliferative, contracting myofibroblast-like cells, producing type I collagen—one of the extracellular matrix's primary components [34–36]. This stellate cell activation can be exacerbated by oxidative stress [37]. Oxidative radicals, through interference with mitochondrial function, can catalyze hepatocyte death (oncotic necrosis, necroptosis and apoptosis) and promote the secretion of proinflammatory mediators [10]. Hence, it is proposed that Reactive Oxygen Species (ROS) could encourage fibrosis by harming hepatocytes or by activating Kupffer cells and HSCs [11,34]. Recent studies underscore AST's positive effects on liver health. It is mainly its antioxidant properties that allow AST to play a protective role [1]. Other scientific reports indicate a controlling effect of AST against glycemia in prediabetes patients at risk for metabolic syndrome with mixed effects on lipid levels [12,13,35,38]. Yang et al. (2016) [14] showed that astaxanthin inhibits the activation of resting-phase HSCs and restores the resting state of activated HSCs in mice. AST also decreased ROS production and elevated the expression of the nuclear erythroid-related factor 2 (NrF2).

4.2. Gene Expression

The study also investigated AST's impact on the expression of specific genes, emphasizing the liver's pivotal role in lipid metabolism. Lipid metabolism within hepatocytes can be divided into three stages: I—lipid acquisition and fatty acid synthesis (de novo lipogenesis); II—lipid storage; III—lipid consumption, including lipolysis, β-oxidation, and secretion of low-density lipoproteins [36,39]. Many studies have shown that genes involved in metabolism are overexpressed or under expressed based on dietary factors.

Our analysis showed that the expression level of *CYP7A1* increased significantly in the AST-treated group. Cholesterol 7α-hydroxylase (*CYP7A1*) is the rate-limiting enzyme in the classical bile acid synthesis pathway. These findings align with those of Liu et al. (2022) [40], who found that AST enhances the fecal excretion of both acidic and neutral sterols derived from cholesterol by increasing *CYP7A1* expression. Similarly, a study by Wang et al. (2022) demonstrated that administering a high dose of AST (0.75%) to mice on a high-fat diet elevated *CYP7A1* expression, compared to mice only on a high-fat diet [41]. From a physiological perspective, the upregulation of *CYP7A1* is advantageous, facilitating cholesterol efflux which protects against excessive increases in plasma cholesterol concentrations.

Our study observed notably diminished levels of *NR1H3* expression in the AST-treated group. *NR1H3* is part of the LXR nuclear receptor superfamily [42], which oversees cholesterol equilibrium, lipoprotein metabolism and fat synthesis [42–44]. Notably, *NR1H3* signaling is associated with liver diseases such as hepatic steatosis. In addition, it contributes to liver triglyceride content by upregulating lipogenic genes [40,45]. Zhang et al. [45] found a correlation between *NR1H3-exon-5-A201C* and fat thickness, emphasizing that *NR1H3* gene expression can modulate lipid accumulation in pigs. Studies have shown that LXRs are prevalent nuclear receptors in HSC. Signaling via these receptors adjusts the gene expression related to metabolism, inflammation and fibrogenesis in primary cells [46,47]. Beaven et al. [47] exemplified this with their discovery that LXR ligands inhibited fibrosis markers and stellate cell activation in primary mouse stellate cells. In the present study, there is a noticeable association between the reduced expression of *CREB* and the decrease in liver tissue collagen percentage in the AST-supplemented group. *CREB* influences stellate cell activation and proliferation, as well as inflammation. Furthermore, studies indicate that *CREB* is involved in extracellular matrix deposition and functional cell loss [48]. Eng and Friedman (2001) [49] posited that, under oxidative stress, a mutated form of *CREB* (*CREB* Ala 133) led to a surge in stellate cells transitioning to

the S phase, initiating HSC proliferation sequences. Moreover, CREB's protective role against hepatocyte apoptosis linked to mitochondria, mediated via the ERK-CREB-Bnip3 axis in hepatic steatosis, has been documented [50]. Wang et al. (2016) emphasized CREB's association with liver fibrosis, revealing enhanced p-CREB-1 expression in fibrotic liver tissues in rats and HSCs exposed to exogenous TGF- β 1, suggesting p-CREB-1 might boost fibrogenesis by enhancing TGF- β 1 expression in liver fibrosis [51]. Furthermore, we noted a marked decrease in NOTCH1 expression in the AST-supplemented pigs. NOTCH signaling pathway plays an important role in adipogenesis processes, such as the proliferation and differentiation of adipocyte progenitors, and is integral to metabolism regulation [52,53]. Yamaguchi et al. [54] showed that NOTCH haploinsufficiency heightens fat accumulation and adipogenesis, underscoring the tie between NOTCH signaling and insulin resistance onset. In mice fed a high-fat diet, NOTCH signaling augments fat storage in the hypothalamus via B cell (NF- κ B) activation [55]. NOTCH signaling's activation in liver fibrosis models and its abnormal amplification in fibrosis patients have been documented, while inhibition of NOTCH has shown protective effects against fibrotic disorders [56]. In our experiment, we also analyzed several liver function-related genes (*APOE*, *ACAA2*, *CYP1A1*, *SIRT3*, *HK1*, *DHCR24*, and *CXCL10*). However, after AST addition, no significant expression changes were identified. These genes encompass a variety of functions: lipid metabolism (*APOE* [57], *ACAA2* [58,59]), exogenous chemical metabolism (*CYP1A1* [60]), mitochondrial fatty acid oxidation (*SIRT3* [61]), antioxidation, free radical scavenging, glucose metabolism (*HK1* [62]), cholesterol synthesis regulation (*SREBF2*, *DHCR24* [63,64]), cellular stress responses (*DHCR24* [63,64]), and liver inflammation augmentation (*CXCL10* [65]). In the case of *CXCL10*, the important information from the point of view of this work is that it promotes liver fibrosis by preventing NK cell-mediated inactivation of hepatic stellate cells [66,67].

Fibrosis markers, such as *COL1A2* [65,66], encode collagen. Both *COL1A1* and *COL1A2* genes exhibit a high sensitivity to reactive oxygen species [68]. It is postulated that under oxidative stress, *COL1A2* mRNA expression escalates, a factor contributing to stellate cell activation [67]. Thus, dampening *COL1A2* expression might inhibit stellate cell activation, offering a potential preventive measure against liver fibrosis [68]. In the present study, we observed no significant changes in *COL1A2* expression in both groups. Similarly intriguing is the absence of significant changes in the expression of *SOD1* and *CAT*. While some literature posits that AST may boost hepatic antioxidants *SOD* and *CAT* through partial induction of the Nrf2 pathway [63]. The increase in *SOD* after AST treatment has been confirmed in a few studies on hens [69], rats [70] and aquatic animals [71]. However, the methods for studying the activity or concentration of *SOD* have varied. Islam et al. [72] proved that the addition of AST could restore *CAT* and *SOD* activity in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis. They argued that AST's potential protective mechanism stems from lipid peroxidation inhibition and stimulating cells of antioxidant systems. We speculate that the lack of change in *SOD* and *CAT* expression in the experiment may be due to insufficient administration of (AST) to the experimental animals.

The obtained findings provide compelling evidence supporting the potential antifibrotic properties of AST, particularly when considering the age of the experimental animals and their weaning period. Nevertheless, the authors acknowledge the constraints of this study, and they propose the need for additional analyses to further explore the effects of astaxanthin on the liver. These suggested investigations encompass immunohistochemical analyses of HSC activity, assessments of serum redox states, and detailed quantifications of interleukin and proinflammatory cytokines. The authors already have planned future studies to expand upon the evidence presented in this study, ensuring a more comprehensive understanding of astaxanthin's impact on liver health.

5. Conclusions

In the experiment, significant differences in histology between animals with and without astaxanthin in the diet were observed. In the group supplemented with AST, there was

a noticeable reduction in collagen fiber deposition in liver sections, suggesting AST's potential role in safeguarding against excessive collagen accumulation. Furthermore, piglets on the astaxanthin regimen exhibited a decline in *NR1H3* expression—a gene whose inhibition can foster recovery from hepatocyte steatosis, and increased expression of *CYP7A1*—a pivotal gene for expelling surplus liver cholesterol through bile acids. Additionally, the downregulation of *NOTCH1* and *CREB* genes was observed, although their exact roles in mitigating liver fibrosis are ambiguous. Gene expression analysis has shown the potential of AST to protect the liver, but further studies are needed to understand the molecular basis of this action.

Author Contributions: Conceptualization, K.S., M.O. and M.Ś.; methodology K.S., M.O. and P.D.; software, K.S. and M.O.; validation, K.S., M.O., P.D. and M.Ś.; formal analysis, K.S., M.O. and M.Ś.; investigation, M.Ś.; resources, M.Ś.; data curation, M.Ś.; writing—original draft preparation, K.S. and M.O.; writing—review and editing, K.S., M.O., P.D. and M.Ś.; visualization, K.S., M.O. and M.Ś.; supervision, M.O., P.D. and M.Ś.; project administration, M.O. and M.Ś.; funding acquisition, M.Ś. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by the statutory activity of the National Research Institute of Animal Production in Poland (project number: 01-16-06-11).

Institutional Review Board Statement: All procedures included in this study relating to the use of live animals agreed with the First Local Ethics Committee for Experiments with Animals in Cracow (Protocol code: 420/2020, date: 22 July 2020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data supporting reported results are in the possession of the authors (K.S., M.O. and M.Ś.).

Acknowledgments: The authors would like to thank Alicja Wierzbicka, for laboratory support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Chen, J.-T.; Kotani, K. Astaxanthin as a Potential Protector of Liver Function: A Review. *J. Clin. Med. Res.* **2016**, *8*, 701–704. [[CrossRef](#)]
- Liu, H.; Liu, M.; Fu, X.; Zhang, Z.; Zhu, L.; Zheng, X.; Liu, J. Astaxanthin Prevents Alcoholic Fatty Liver Disease by Modulating Mouse Gut Microbiota. *Nutrients* **2018**, *10*, 1298. [[CrossRef](#)]
- Xuan, R.R.; Niu, T.T.; Chen, H.M. Astaxanthin Blocks Preeclampsia Progression by Suppressing Oxidative Stress and Inflammation. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *14*, 2697–2704. [[CrossRef](#)]
- Goto, S.; Kogure, K.; Abe, K.; Kimata, Y.; Kitahama, K.; Yamashita, E.; Terada, H. Efficient Radical Trapping at the Surface and inside the Phospholipid Membrane Is Responsible for Highly Potent Antiperoxidative Activity of the Carotenoid Astaxanthin. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2001**, *1512*, 251–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- McNulty, H.P.; Byun, J.; Lockwood, S.F.; Jacob, R.F.; Mason, R.P. Differential Effects of Carotenoids on Lipid Peroxidation Due to Membrane Interactions: X-Ray Diffraction Analysis. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 167–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pham-Huy, L.A.; He, H.; Pham-Huy, C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.* **2008**, *4*, 89.
- Sanchez-Valle, V.; Chavez-Tapia, N.C.; Uribe, M.; Mendez-Sanchez, N. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4850–4860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kolios, G.; Valatas, V.; Kouroumalis, E. Role of Kupffer Cells in the Pathogenesis of Liver Disease. *World J. Gastroenterol.* **2006**, *12*, 7413–7420. [[CrossRef](#)]
- Friedman, S.L. Molecular Regulation of Hepatic Fibrosis, an Integrated Cellular Response to Tissue Injury. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2247–2250. [[CrossRef](#)]
- Jaeschke, H. Reactive Oxygen and Mechanisms of Inflammatory Liver Injury: Present Concepts. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2011**, *26*, 173–179. [[CrossRef](#)]
- Lieber, C.S. Alcoholic Liver Disease: New Insights in Pathogenesis Lead to New Treatments. *J. Hepatol.* **2000**, *32*, 113–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ciaraldi, T.P.; Boeder, S.C.; Mudaliar, S.R.; Giovannetti, E.R.; Henry, R.R.; Pettus, J.H. Astaxanthin, a Natural Antioxidant, Lowers Cholesterol and Markers of Cardiovascular Risk in Individuals with Prediabetes and Dyslipidaemia. *Diabetes Obes. Metab.* **2023**, *25*, 1985–1994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Choi, H.D.; Youn, Y.K.; Shin, W.G. Positive Effects of Astaxanthin on Lipid Profiles and Oxidative Stress in Overweight Subjects. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2011**, *66*, 363–369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Yang, Y.; Bae, M.; Kim, B.; Park, Y.K.; Koo, S.I.; Lee, J.Y. Astaxanthin Prevents and Reverses the Activation of Mouse Primary Hepatic Stellate Cells. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *29*, 21–26. [[CrossRef](#)]
15. Sila, A.; Kamoun, Z.; Ghilissi, Z.; Makni, M.; Nasri, M.; Sahnoun, Z.; Nedjar-Arroume, N.; Bougatef, A. Ability of Natural Astaxanthin from Shrimp By-Products to Attenuate Liver Oxidative Stress in Diabetic Rats. *Pharmacol. Rep.* **2015**, *67*, 310–316. [[CrossRef](#)]
16. Ni, Y.; Nagashimada, M.; Zhuge, F.; Zhan, L.; Nagata, N.; Tsutsui, A.; Nakanuma, Y.; Kaneko, S.; Ota, T. Astaxanthin Prevents and Reverses Diet-Induced Insulin Resistance and Steatohepatitis in Mice: A Comparison with Vitamin E. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 17192. [[CrossRef](#)]
17. Zhang, Z.; Guo, C.; Jiang, H.; Han, B.; Wang, X.; Li, S.; Lv, Y.; Lv, Z.; Zhu, Y. Inflammation Response after the Cessation of Chronic Arsenic Exposure and Post-Treatment of Natural Astaxanthin in Liver: Potential Role of Cytokine-Mediated Cell-Cell Interactions. *Food Funct.* **2020**, *11*, 9252–9262. [[CrossRef](#)]
18. Jia, Y.; Wu, C.; Kim, J.; Kim, B.; Lee, S.-J. Astaxanthin Reduces Hepatic Lipid Accumulations in High-Fat-Fed C57BL/6J Mice via Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) Alpha and Inhibition of PPAR Gamma and Akt. *J. Nutr. Biochem.* **2016**, *28*, 9–18. [[CrossRef](#)]
19. van Beers-Schreurs, H.M.; Vellenga, L.; Wensing, T.; Breukink, H.J. The Pathogenesis of the Post-Weaning Syndrome in Weaned Piglets: A Review. *Vet. Q.* **1992**, *14*, 29–34. [[CrossRef](#)]
20. Seki, E.; Schnabl, B. Role of Innate Immunity and the Microbiota in Liver Fibrosis: Crosstalk between the Liver and Gut. *J. Physiol.* **2012**, *590*, 447–458. [[CrossRef](#)]
21. Bailey, S.M.; Cunningham, C.C. Contribution of Mitochondria to Oxidative Stress Associated with Alcoholic Liver Disease. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, *32*, 11–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Thayer, W.S.; Rubin, E. Antimycin Inhibition as a Probe of Mitochondrial Function in Isolated Rat Hepatocytes Effects of Chronic Ethanol Consumption. *BBA Mol. Cell Res.* **1982**, *721*, 328–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Luo, Z.; Zhu, W.; Guo, Q.; Luo, W.; Zhang, J.; Xu, W.; Xu, J. Weaning Induced Hepatic Oxidative Stress, Apoptosis, and Aminotransferases through MAPK Signaling Pathways in Piglets. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, *2016*, 4768541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Szczepanik, K.; Furgał-Dierżuk, I.; Gala, Ł.; Świątkiewicz, M. Effects of Hermetia Illucens Larvae Meal and Astaxanthin as Feed Additives on Health and Production Indices in Weaned Pigs. *Animals* **2023**, *13*, 163. [[CrossRef](#)]
25. Bergstrom, J.R.; Nelssen, J.L.; Tokach, M.D.; DeRouchey, J.M.; Goodband, R.D.; Dritz, S.S. An Evaluation of Astaxanthin as a Nutraceutical Growth Promoter in Starter Diets for Weanling Pigs. *Kans. Agric. Exp. Stn. Res. Rep.* **2007**, *10*, 83–87. [[CrossRef](#)]
26. Miki, W. Biological Functions and Activities of Animal Carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **1991**, *63*, 141–146. [[CrossRef](#)]
27. Igielska-Kalwat, J.; Gościańska, J.; Nowak, I. Carotenoids as natural antioxidants. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2015**, *69*, 418–428. [[CrossRef](#)]
28. Grela, E.R.; Skomiał, J. *Zalecenia żywieniowe i Wartość Pokarmowa Pasz Dla Świń. Normy żywienia Świń.*; Wyd. Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN: Jabłonna, Poland, 2020.
29. Horwitz, W. *Official Methods of Analyses*, 17th ed.; AOAC: Gaithersburg, MD, USA, 2009.
30. Hoffmann, L.; Schiemann, R. Von Der Kalorie Zum Joule: Neue Größenbeziehungen Bei Messungen Des Energieumsatzes Und Bei Der Berechnung von Kennzahlen Der Energetischen Futterbewertung. *Archiv. Tierernaehrung* **1980**, *30*, 733–742. [[CrossRef](#)]
31. Campbell, J.M.; Crenshaw, J.D.; Polo, J. The Biological Stress of Early Weaned Piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2013**, *4*, 19. [[CrossRef](#)]
32. Pluske, J.R.; Kerton, D.J.; Cranwell, P.D.; Campbell, R.G.; Mullan, B.P.; King, R.H.; Power, G.N.; Pierzynowski, S.G.; Westrom, B.; Rippe, C.; et al. Age, Sex, and Weight at Weaning Influence Organ Weight and Gastrointestinal Development of Weanling Pigs. *Aust. J. Agric. Res.* **2003**, *54*, 515–527. [[CrossRef](#)]
33. Kisseleva, T.; Brenner, D.A. Role of Hepatic Stellate Cells in Fibrogenesis and the Reversal of Fibrosis. *J. Gastroen. Hepatol.* **2007**, *22*, S73–S78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jiang, J.X.; Török, N.J. Liver Injury and the Activation of the Hepatic Myofibroblasts. *Curr. Pathobiol. Rep.* **2013**, *1*, 215–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Shen, M.; Chen, K.; Lu, J.; Cheng, P.; Xu, L.; Dai, W.; Wang, F.; He, L.; Zhang, Y.; Chengfen, W.; et al. Protective Effect of Astaxanthin on Liver Fibrosis through Modulation of TGF- β 1 Expression and Autophagy. *Mediat. Inflamm.* **2014**, *2014*, 954502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Wynn, T.A. Common and Unique Mechanisms Regulate Fibrosis in Various Fibroproliferative Diseases. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 524–529. [[CrossRef](#)]
37. Friedman, S.L. Evolving Challenges in Hepatic Fibrosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2010**, *7*, 425–436. [[CrossRef](#)]
38. Uchiyama, A. Clinical Efficacy of Astaxanthin-Containing Haematococcus Pluvialis Extract for the Volunteers at Risk of Metabolic Syndrome. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2008**, *43*, 38–43.
39. Enjoji, M.; Kohjima, M.; Nakamura, M. Lipid Metabolism and the Liver. In *The Liver in Systemic Diseases*; Springer: Tokyo, Japan, 2016.
40. Nakamura, M.; Fujino, T.; Yada, R.; Yada, M.; Yasutake, K.; Yoshimoto, T.; Harada, N.; Higuchi, N.; Kato, M.; Kohjima, M.; et al. Impact of Cholesterol Metabolism and the LXRx-SREBP-1c Pathway on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Med.* **2009**, *23*, 603–608. [[CrossRef](#)]

41. Wang, M.; Xu, W.; Yu, J.; Liu, Y.; Ma, H.; Ji, C.; Zhang, C.; Xue, J.; Li, R.; Cui, H. Astaxanthin From Haematococcus Pluvialis Prevents High-Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Mice by Gut-Liver Axis Modulating Properties. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 840648. [[CrossRef](#)]
42. Zhang, X.; Liu, J.; Su, W.; Wu, J.; Wang, C.; Kong, X.; Gustafsson, J.Å.; Ding, J.; Ma, X.; Guan, Y. Liver X Receptor Activation Increases Hepatic Fatty Acid Desaturation by the Induction of SCD1 Expression through an LXR α -SREBP1c-Dependent Mechanism. *J. Diabetes* **2014**, *6*, 212–220. [[CrossRef](#)]
43. Calkin, A.C.; Tontonoz, P. Liver X Receptor Signaling Pathways and Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2010**, *30*, 1513–1518. [[CrossRef](#)]
44. Jakobsson, T.; Treuter, E.; Gustafsson, J.Å.; Steffensen, K.R. Liver X Receptor Biology and Pharmacology: New Pathways, Challenges and Opportunities. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*, 394–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Zhang, B.; Shang, P.; Qiangba, Y.; Xu, A.; Wang, Z.; Zhang, H. The Association of NR1H3 Gene with Lipid Deposition in the Pig. *Lipids Health Dis.* **2016**, *15*, 99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Zelcer, N.; Tontonoz, P. Liver X Receptors as Integrators of Metabolic and Inflammatory Signaling. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 607–614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Beaven, S.W.; Wroblewski, K.; Wang, J.; Hong, C.; Bensinger, S.; Tsukamoto, H.; Tontonoz, P. Liver X Receptor Signaling Is a Determinant of Stellate Cell Activation and Susceptibility to Fibrotic Liver Disease. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 1052–1062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Li, G.; Jiang, Q.; Xu, K. CREB Family: A Significant Role in Liver Fibrosis. *Biochimie* **2019**, *163*, 94–100. [[CrossRef](#)]
49. Eng, F.J.; Friedman, S.L. Transcriptional Regulation in Hepatic Stellate Cells. *Semin. Liver Dis.* **2001**, *21*, 385–396. [[CrossRef](#)]
50. Li, R.; Xin, T.; Li, D.; Wang, C.; Zhu, H.; Zhou, H. Therapeutic Effect of Sirtuin 3 on Ameliorating Nonalcoholic Fatty Liver Disease: The Role of the ERK-CREB Pathway and Bnip3-Mediated Mitophagy. *Redox Biol.* **2018**, *18*, 229–243. [[CrossRef](#)]
51. Wang, P.; Deng, L.; Zhuang, C.; Cheng, C.; Xu, K. P-CREB-1 Promotes Hepatic Fibrosis through the Transactivation of Transforming Growth Factor-1 Expression in Rats. *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *38*, 521–528. [[CrossRef](#)]
52. Ferrando, A.A. The Role of NOTCH1 Signaling in T-ALL. *Hematol./Educ. Program Am. Soc. Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2009**, *2009*, 353–361. [[CrossRef](#)]
53. Takeshita, K.; Satoh, M.; Ii, M.; Silver, M.; Limbourg, F.P.; Mukai, Y.; Rikitake, Y.; Radtke, F.; Gridley, T.; Losordo, D.W.; et al. Critical Role of Endothelial Notch1 Signaling in Postnatal Angiogenesis. *Circ. Res.* **2007**, *100*, 70–78. [[CrossRef](#)]
54. Yamaguchi, K.; Hayashi, M.; Uchida, Y.; Cheng, X.W.; Nakayama, T.; Matsushita, T.; Murohara, T.; Takeshita, K. Notch1 Haploinsufficiency in Mice Accelerates Adipogenesis. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 16761. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Li, J.; Tang, Y.; Cai, D. IKK β /NF-KB Disrupts Adult Hypothalamic Neural Stem Cells to Mediate a Neurodegenerative Mechanism of Dietary Obesity and Pre-Diabetes. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *14*, 999–1012. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Zhang, X.; Du, G.; Xu, Y.; Li, X.; Fan, W.; Chen, J.; Liu, C.; Chen, G.; Liu, C.; Zern, M.A.; et al. Inhibition of Notch Signaling Pathway Prevents Cholestatic Liver Fibrosis by Decreasing the Differentiation of Hepatic Progenitor Cells into Cholangiocytes. *Lab. Investig.* **2016**, *96*, 350–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Mensenkamp, A.R.; Jong, M.C.; Van Goor, H.; Van Luyn, M.J.A.; Bloks, V.; Havinga, R.; Voshol, P.J.; Hofker, M.H.; Van Dijk, K.W.; Havekes, L.M.; et al. Apolipoprotein E Participates in the Regulation of Very Low Density Lipoprotein-Triglyceride Secretion by the Liver. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 35711–35718. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Wan, J.J.; Lin, C.H.; Ren, E.D.; Su, Y.; Zhu, W.Y. Effects of Early Intervention with Maternal Fecal Bacteria and Antibiotics on Liver Metabolome and Transcription in Neonatal Pigs. *Front. Physiol.* **2019**, *10*, 171. [[CrossRef](#)]
59. Sodhi, S.S.; Ghosh, M.; Song, K.D.; Sharma, N.; Kim, J.H.; Kim, N.E.; Lee, S.J.; Kang, C.W.; Oh, S.J.; Jeong, D.K. An Approach to Identify SNPs in the Gene Encoding Acetyl-CoA Acetyltransferase-2 (ACAT-2) and Their Proposed Role in Metabolic Processes in Pig. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e102432. [[CrossRef](#)]
60. Fujii-Kuriyama, Y.; Imataka, H.; Sogawa, K.; Yasumoto, K.; Kikuchi, Y. Regulation of CYP1A1 Expression. *FASEB J.* **1992**, *6*, 706–710. [[CrossRef](#)]
61. Hirshey, M.D.; Shimazu, T.; Goetzman, E.; Jing, E.; Schwer, B.; Lombard, D.B.; Grueter, C.A.; Harris, C.; Biddinger, S.; Ilkayeva, O.R.; et al. SIRT3 Regulates Mitochondrial Fatty-Acid Oxidation by Reversible Enzyme Deacetylation. *Nature* **2010**, *464*, 121–125. [[CrossRef](#)]
62. Li, Y.; Tian, H.; Luo, H.; Fu, J.; Jiao, Y.; Li, Y. Prognostic Significance and Related Mechanisms of Hexokinase 1 in Ovarian Cancer. *Onco Targets Ther.* **2020**, *13*, 11583–11594. [[CrossRef](#)]
63. Yang, Y.; Seo, J.M.; Nguyen, A.; Pham, T.X.; Park, H.J.; Park, Y.; Kim, B.; Bruno, R.S.; Lee, J. Astaxanthin-Rich Extract from the Green Alga Haematococcus Pluvialis Lowers Plasma Lipid Concentrations and Enhances Antioxidant Defense in Apolipoprotein E Knockout Mice. *J. Nutr.* **2011**, *141*, 1611–1617. [[CrossRef](#)]
64. Kalinowski, C.T.; Betancor, M.B.; Torrecillas, S.; Sprague, M.; Larroquet, L.; Véron, V.; Panserat, S.; Izquierdo, M.S.; Kaushik, S.J.; Fontagné-Dicharry, S. More Than an Antioxidant: Role of Dietary Astaxanthin on Lipid and Glucose Metabolism in the Liver of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Antioxidants* **2023**, *12*, 136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Zhai, Y.; Shen, X.D.; Gao, F.; Zhao, A.; Freitas, M.C.; Lassman, C.; Luster, A.D.; Busuttil, R.W.; Kupiec-Weglinski, J.W. CXCL10 Regulates Liver Innate Immune Response against Ischemia and Reperfusion Injury. *Hepatology* **2008**, *47*, 207–214. [[CrossRef](#)]
66. Hintermann, E.; Bayer, M.; Pfeilschifter, J.M.; Luster, A.D.; Christen, U. CXCL10 Promotes Liver Fibrosis by Prevention of NK Cell Mediated Hepatic Stellate Cell Inactivation. *J. Autoimmun.* **2010**, *35*, 424–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

67. Zeremski, M.; Dimova, R.; Astemborski, J.; Thomas, D.L.; Talal, A.H. CXCL9 and CXCL10 Chemokines as Predictors of Liver Fibrosis in a Cohort of Primarily African-American Injection Drug Users with Chronic Hepatitis C. *C. J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 832–836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Nieto, N. Ethanol and Fish Oil Induce NFκB Transactivation of the Collagen A2(I) Promoter through Lipid Peroxidation-Driven Activation of the PKC-PI3K-Akt Pathway. *Hepatology* **2007**, *45*, 1433–1445. [[CrossRef](#)]
69. Dansou, D.M.; Wang, H.; Nugroho, R.D.; He, W.; Zhao, Q.; Zhang, J. Assessment of Response to Moderate and High Dose Supplementation of Astaxanthin in Laying Hens. *Animals* **2021**, *11*, 1138. [[CrossRef](#)]
70. Monmeesil, P.; Fungfuang, W.; Tulayakul, P.; Pongchairerk, U. The Effects of Astaxanthin on Liver Histopathology and Expression of Superoxide Dismutase in Rat Aflatoxicosis. *J. Vet. Med. Sci.* **2019**, *81*, 1162–1172. [[CrossRef](#)]
71. Zhu, X.; Hao, R.; Zhang, J.; Tian, C.; Hong, Y.; Zhu, C.; Li, G. Dietary Astaxanthin Improves the Antioxidant Capacity, Immunity and Disease Resistance of Coral Trout (*Plectropomus leopardus*). *Fish Shellfish. Immunol.* **2022**, *122*, 38–47. [[CrossRef](#)]
72. Islam, M.A.; Al Mamun, M.A.; Faruk, M.; Ul Islam, M.T.; Rahman, M.M.; Alam, M.N.; Towheedur Rahman, A.F.M.; Reza, H.M.; Alam, M.A. Astaxanthin Ameliorates Hepatic Damage and Oxidative Stress in Carbon Tetrachloride-Administered Rats. *Pharmacogn. Res.* **2017**, *9*, S84–S91. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

HERMETIA ILLUCENS AS A SOURCE OF ANTIMICROBIAL PEPTIDES – A REVIEW OF IN VITRO AND IN VIVO STUDIES

Kinga Szczepanik*, Małgorzata Świątkiewicz

Department of Animal Nutrition and Feed Science, National Research Institute of Animal Production, 32-083 Balice n. Kraków, Poland

*Corresponding author: kinga.szczepanik@iz.edu.pl

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are the focus of this manuscript, as bioconservative molecules that constitute a major defense mechanism in many organisms. Various antimicrobial peptides have been isolated and identified, but AMPs derived from *Hermetia illucens* (HI) will be the focus of this review. The review focuses mainly on cecropins, defensins, and attacins. *Hermetia illucens* is a remarkable organism adapted to life in a diverse, often highly polluted environment, and its resilience is largely attributed to AMPs. AMPs are active against many bacterial and fungal species and also act to induce the osmotic lysis of protozoa. They attack pathogenic microorganisms without damaging host cells in the process. Given the increasing antibiotic resistance of many bacterial strains in animal production, AMPs appear to be a tempting alternative as substances that limit and inhibit the growth and development of pathogens, as well as an option in veterinary medicine as potential substitutes for antibiotics, the administration of which must be limited in the European Union. The AMP content of HI larvae extracts, which determines their activity, depends on the larval diet and the solvent used. This review presents *in vitro* studies on the effects of AMPs from *Hermetia illucens* on microorganisms and *in vivo* studies on the potential of HI larvae meal as a feed supplement.

Key words: AMPs, *Hermetia illucens*, antimicrobial, peptides, cecropins, attacins, defensins

Antimicrobial peptides (AMPs) of insect origin – structure and mechanisms of action

Structure and classification of AMPs

Antimicrobial peptides were discovered in the 1980s in skin isolates of the African clawed frog *Xenopus laevis*. These peptides were found to be active against many species of bacteria and fungi and induced osmotic lysis of protozoa (Zasloff et al., 1988; Zasloff, 1987, Lee et al., 2016; Xia et al., 2021). Over the ensuing years, a wide variety of peptides have been isolated and identified from many organisms; however, in this review, the AMPs from insects will be in focus of interest. Insects are found all over the world, inhabiting a wide variety of environments. At present, 3569 antimicrobial peptides from six life kingdoms have been described in the Antimicrobial Peptide Database (380 isolated from bacteria, 5 from archaeons, 8 from protists, 25 from fungi, 371 from plants, and 2600 from animals (accessed on 10 January 2023; Moretta et al., 2020; <https://aps.unmc.edu/>). The ability to survive is linked to these organisms' immune systems, based solely on the innate immune response, which allows for a broad and rapid response to the threat of a pathogen (Moretta et al., 2020; Sultana et al., 2021). AMPs are synthesized in insects in the fat body and then secreted into the hemolymph (Bulet et al.,

1999) and are evolutionarily conserved biomolecules that exhibit selective cytotoxicity. This means that they attack pathogenic microorganisms and do not damage host cells in the process. This mechanism is due to fundamental differences in the structure of host cells compared to pathogens (Ebenhan et al., 2014). AMPs consist of amino acid sequences ranging from 5 to 50 chains in length, and most of them are positively charged peptides due to their high content of arginine and lysine residues (Sultana et al., 2021). Specific electrostatic forces between positive amino acid residues of the peptide and negative charges exposed on the surface of microorganism cells allow peptides to interact with bacterial membranes (Moretta et al., 2020). Peptides are diverse in amino acid sequence and secondary structure; however, they share some common properties, including an affinity for negatively charged phospholipids, which are present on the outer surfaces of the cytoplasmic membrane of many microbial species (Lata et al., 2007). Most AMPs format the ion channels or transmembrane pores to destroy the pathogenic bacterial cell, and their main targets are lipids in the bacterial cell membrane (Józefiak and Engberg, 2017). AMP molecules can be divided into several groups depending on their structure. There are peptides with an α -helix structure, peptides with a β -sheet structure stabilized by

disulfide bridges, and also peptides with an extended or loop structure (Lai and Gallo, 2009). Insect AMPs are divided into three groups based on their amino acid sequence and structure: (1) defensins, (2) cecropins, and (3) peptides with an overrepresentation of proline and/or glycine residues (Mylonakis et al., 2016; Wu et al., 2018).

Defensins

Defensins are small cationic peptides of about 3–4 kDa containing six disulfide-paired cysteines. Three structurally distinct families of these peptides have been identified: “classical” defensins, β -defensins, and insect defensins (Ganz and Lehrer, 1995) found in all insect species studied. They are produced in fat body cells and hemocytes and secreted into the hemolymph, where their concentrations are in the micromolar range (Bulet and Stocklin, 2005). The defensins consist of an α -helix connected by a loop to an antiparallel β -sheet and are composed of about 38–45 amino acids (Ganz and Lehrer, 1995). Most insect defensins act against Gram-positive bacteria, although some also inhibit Gram-negative bacteria (Hoffmann and Hetru, 1992; Tonk et al., 2015) or act only against filamentous fungi (Langen et al., 2006). Defensins bind to the cell membrane or form pore-like cavities in the cell membrane through which essential ions and nutrients flow (Wu et al., 2018).

Cecropins

Cecropin is named after the giant silk moth *Hyalophora cecropia* (cecropia moth), from which the peptide was first isolated (Moore et al., 1994). Cecropins are composed of 29–42 amino acids and lack cysteine

and methionine. A characteristic of most cecropins is the presence of tryptophan as the first or second N-terminal amino acid and the presence of an amide group at the C-terminus (Bulet and Stocklin, 2005). They exhibit primarily bactericidal activity against Gram-negative and to a lesser extent Gram-positive bacteria (Bulet and Stocklin, 2005). Cecropins can disintegrate bacterial cell membranes, inhibit proline uptake, and cause cell membrane lysis (Moore et al., 1996; Wu et al., 2018). In addition to its antimicrobial properties, studies report an apoptotic effect in cancer cells. Cecropins specifically target tumor cells by binding to the phospholipid phosphatidylserine, which is located on the outer surface of plasma membranes of tumor cells (Makwana et al., 2023).

Attacins

Attacins are glycine-rich proteins that are effective against Gram-negative bacteria (Wu et al., 2018). Because of their large size, attacins need to be produced as recombinant proteins before antimicrobial characterization. Attacin causes increased outer membrane permeability and inhibition of outer membrane protein synthesis at the transcriptional level. This is accompanied by growth inhibition (Carlsson et al., 1998). The activity of attacins seems to be linked with some sections of the sequence with particular chemo-physical properties (e.g., positive charge, the abundance of hydrophobic residues) which can cause membrane interaction and subsequent antimicrobial activity (Buonocore et al., 2021). Their activity can also be directed against methicillin-resistant bacteria and infective protozoan agents.

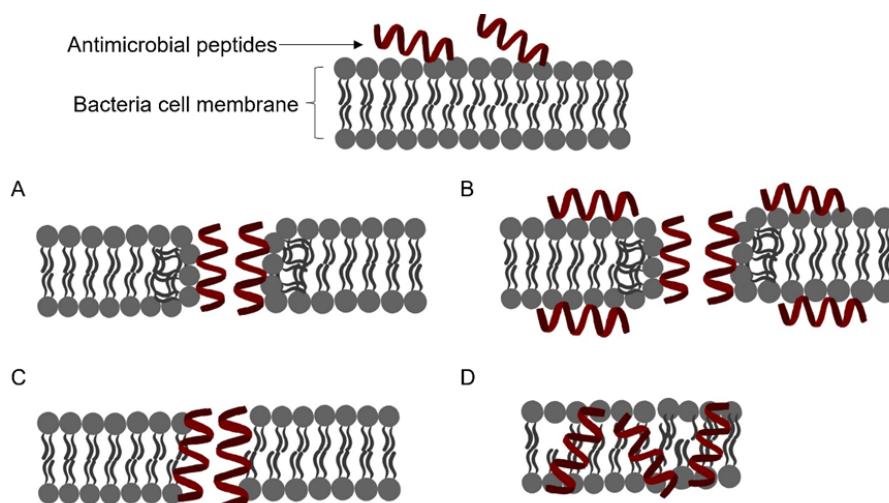


Figure 1. Mechanisms of action of antimicrobial peptides – scheme. A – Toroidal pore model. The peptides aggregate into lipid monolayers and form pores, ultimately destroying the bacterial cell. B – Carpet-like model. Peptide molecules accumulate on the surface of the cell membrane, displacing phospholipids from it. This results in changes in its fluidity, with consequent disintegration of the membrane and leakage of cytoplasmic components. C – Barrel-stave model. α -helical peptides form a bundle with a channel in the center of the membrane, resulting in the formation of pores in the membrane that allow leakage of cytoplasmic components and a decrease in membrane potential. D – Aggregate model. AMPs bind to the anionic cytoplasmic membrane, causing peptides and lipids to form a peptide-lipid micelle complex. The channels formed by AMPs, lipids, and water allow ions and intracellular contents to leak out, resulting in cell death. The channels facilitate the passage of AMPs into the cytoplasm.

Figure 1 is based on Yeaman and Yount (2003); Źyłowska et al. (2011); Xia et al. (2021); Zhang et al. (2021)

Mechanism of action of antibacterial peptides

The mechanisms of AMP antimicrobial action are mostly based on AMPs' ability to break down and disrupt the lipid layer. Mechanisms (Figure 1) include the toroidal pore, carpet-like, barrel-stave, and aggregate model (Yeaman and Yount, 2003; Źyłowska et al., 2011; Zhang et al., 2021; Xia et al., 2021). In addition to cell membrane disintegration, some AMPs can spontaneously pass through cell membranes, interact with intracellular molecules, and thereby interfere with intracellular metabolic processes (Xia et al., 2021).

Due to the increasing antibiotic resistance of bacteria, new solutions are being sought to treat both humans and animals (Wang et al., 2016). The potential effects of insect-derived antimicrobial peptides on the health and productivity of livestock have begun to be investigated and alternative substances based on antimicrobial peptides are being studied.

Antimicrobial peptides in the black soldier fly (*Hermetia illucens*, HI)

Hermetia illucens, also known as the black soldier fly (BSF) belongs to the order *Diptera* in the family *Strautiomyidae*. It is native to the Americas and now occurs worldwide in tropical and temperate regions (Wang and Shelomi, 2017). *Hermetia illucens* is used for bioconversion of organic waste, as a feed additive for livestock and aquaculture, and is economically one of the most important farm insects in the world (Vogel et al., 2018). Because the black soldier fly (HI) lives in an environment inhabited by a wide variety of microorganisms and feeds on decomposing organic material, it is believed to have a strong expression of AMPs and other substances with antimicrobial activity (Müller et al., 2017). In recent years, there has been intensive research into the antibacterial peptides produced by *Hermetia illucens* (Table 1). HI has been shown to express more than 50 genes encoding putative AMPs (Van Moll et al., 2022). In addition to their immunological role, AMPs also maintain and shape the HI gut bacterial community (Vogel et al., 2018). Studies indicate that a diet supplemented with a mixture of bacteria or direct injection of bacteria triggers immune responses in *H. illucens* (Zdybicka-Barabas et al., 2017; Vogel et al., 2018). In their study, Vogel et al. (2018) predicted the existence of 6 attacins, 7 cecropins, 26 defensins, 10 diptericins, and 4 knottin-like peptides. A major role in identifying new HI-derived AMPs such as defensin-like peptide (DLP) was played by Parker et al. (2015). In 2015, a study identified a new peptide, the defensin-like peptide (Park et al., 2015). HI larvae were immunized by puncturing them with a thin needle dipped in *S. aureus* (KCCM 40881). Purified DLP4 showed a molecular weight of 4.27 kDa and antimicrobial activity for Gram-positive bacteria. An antimicrobial peptide showing activity against Gram-negative bacteria was induced and purified from the identically immunized hemolymph of HI larvae (Park and Yoe, 2017 a). The

purified cecropin-like peptide 1 (CLP1) showed a 4.84 kDa molecular weight. Another study (Park and Yoe, 2017 b) revealed a DLP3 peptide of 4.25 kDa isolated from HI larvae immunized as before. Minimum inhibitory concentration (MIC) analysis revealed that DLP3 has strong activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Expression of CLP1 and DLP4 was negligible in the whole body before immunization and was mainly seen in the fat body after immunization with *S. aureus* bacteria (KCCM 40881; Park et al., 2015; Park and Yoe, 2017 a). Research by Shin and Park (2019) has yielded information on a new attacin from HI. The larvae were immunized by puncture with a thin needle dipped in *E. coli* (KCCM 11234) and subsequently an attacin with a molecular weight of 17.7 kDa was induced from the fat body. As with DLP3, DLP4, and CLP1, HI-attacin expression was detectable only after prior immunization of the larvae. The HI-attacin showed antibacterial activities against *E. coli* and MRSA. Elhag et al. (2017) conducted an experiment that resulted in the identification of seven new gene fragments of three types of antimicrobial peptides, named cecropinZ1, sarcotoxin1, sarcotoxin (2a), sarcotoxin (2b), sarcotoxin3, stomoxynZH1, and stomoxynZH1(a). StomoxynZH1 was expressed as a thioredoxin fusion protein in bacteria. The results showed that stomoxynZH1 exhibited different MIC levels against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, the Gram-negative bacteria *Escherichia coli*, and the fungi *Rhizoctonia solani* Khün (rice)-10 and *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary-14. Research has been conducted by Xu et al. (2020) on the identification of new HI-derived AMP genes, which contributed to the discovery of Hidefensin-1 (10.2 kDa), Hidiptericin-1 (21.9 kDa) and HiCG13551 (9.5 kDa). HI larvae were immunized by the injection of bacterial strains, successively *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Bacillus bombyseptieus*. It was detected that *in vitro*, Hidefensin-1 and Hidiptericin-1 inhibited the growth of *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*, while HiCG13551 inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* and *E. coli*. According to the AMP Database Search, Park et al. (2015) identified defensin-like peptide 2 (DLP2). APD analysis reveals that the sequence of this peptide shows 85% similarity to DLP4. The peptide has a molar mass of 4.27 kDa and exhibits antimicrobial activity against *S. aureus* (MRSA) (Li et al., 2020). Moretta et al. (2020) conducted a study of the transcriptome of larvae and combined adult male and female *H. illucens*, and all sequences that presumably encode AMP were analyzed using various machine learning algorithms. Fifty-seven potentially active peptides were identified and subsequently four that showed high antimicrobial score values in all prediction programs were selected and chemically synthesized. The selected AMPs were Hill_BB_C6571, Hill_BB_C16634, Hill_BB_C46948, and Hill_BB_C7985. All synthesized peptides showed activity against *E. coli*.

Table 1. Antimicrobial peptides from *Hermetia illucens*

AMP	AMP family	Sequence	References
HI-attacin	attacin	MASKFLGNPNHNIGGGVFAAGNTRNSTPSLGAFGTLNLKDHSLGVSHTI TPGVSDTFSQNARLNILKTPDHRVDANFNSHTRLNNNGFAFDKRGGSLD YTHRAGHGLSLGASHIPKFGTAAELTGKANLWRSPSGLSTFDLTSASRT FGGPMAGRNNFGAGLGFSHRF	Shin et al., 2019
CLP1 (Cecropin-like peptide 1)	cecropin	MNFTKLFVVFAVVLVAFAFGQSEAGWRKRVFKPVEKGQRVRDAGVQGIA IAQQGANVLATARGGPPQQG	Park et al., 2017
CLP2 (Cecropin-like peptide 2)	cecropin	MNFAKLFVVFAIVLVAFSGQSEAGWWKRVFKPVEKLGQRVRDAGIQGLEI AQQGANVLATARGGPPQQG	Park et al., 2017
CLP3 (Cecropin-like peptide 3)	cecropin	MNFTKLFVVFAVVLIAFSGQSEAGWWKRVFKPVERLGQRVRDAGIQGLEI AQQGANVLATVRGGPPQQG	Park et al., 2017
DLP1 (Defensin-like peptide 1)	defensin	MRSVLVGLIVAAFAYTSAQPYQLQYEEDGLDQAELPIEEEQLPSQVVE QHYRAKRATCDLLSPFKVGHAAACALHCIALGRGGWCDGRAVCNCRR	Park et al., 2015
DLP2 (Defensin-like peptide 2)	defensin	MRSILVGLIVAAFAYTSAQPYQLQYEEDGPGYALELPSEEGLPSQVVE QHYRAKRATCDLLSPFKVGHAAACALHCIAMGRGGWCDGRAVCNCRR	Park et al., 2015
DLP3 (Defensin-like peptide 3)	defensin	MRSILVGLIVAVFGVYTSQPYQLQYEEDGPEYALVLPPIEEEELPSQVVEQ HYRAKRATCDLLSPFGVGHAACAVHCIAMGRGGWCDRAVCNCRR	Park et al., 2017
DLP4 (Defensin-like peptide 4)	defensin	MVHCQPQLETEGDQQLEPVVAEVDDVVVLVAIPEHTREKRATCDLLSPF KVGHAAACAHCIARGKRGGWCDKRAVCNCRK	Park et al., 2015
Hidefensin 1	defensin	ATCDLLSATVKSTACAAHCLLKGKGGYCNSKLVCVCR	Xu et al., 2020
Hill_BB_C6571	defensin	ATCTNWNCRTQCIARGKRGGYCVERNICKCTS	Moretta et al., 2020
Hill_BB_C16634	defensin	Uknow	Moretta et al., 2020
Hill_BB_C46948	defensin	RKCTASQCCTRCKKLGYKRGYQCSSTKCV	Moretta et al., 2020
Hill_BB_C7985	defensin	FTCSNLGCKAACIILGNRSGGCNRLGVCQCN	Moretta et al., 2020
Hidiptericin-1	diptericin	Uknow	Xu et al., 2020
Sarcotoxin1	sarcotoxin	GWLKRKIGMKFILGTTLAIVVAIFGQCQAATWSYNPNNGATVTWTANVA ATAR	Elhag et al., 2017
Sarcotoxin (2a)	sarcotoxin	GWLKRKIGKKFILGTTLAIVVAIFGQCQAATWSYNPNNGATVTWTANVA ATAR	Elhag et al., 2017
Sarcotoxin (2b)	sarcotoxin	GWLKRKIGKKFILGTTLAJAVAIFGQCQAATWSYNPNNGATVTWTANVA ATAR	Elhag et al., 2017
Sarcotoxin3	sarcotoxin	GWLKRKIGMMMKNSNFNSTEEREEAKKNYKRKYVPWFSGANVAATAR	Elhag et al., 2017
StomoxynZH1	stomoxyn	RGFRKHFNLPICVEGLLAGDIGSILLGVESDIGALAGAIANLALIAGECAA QGEAGAAVVAAT	Elhag et al., 2017
HiCG13551	IATP	Uknow	Xu et al., 2020

Research on the effects of *Hermetia illucens* AMPs on microorganisms – *in vitro* studies

Due to the increasing antibiotic resistance of many bacterial strains, antimicrobial peptides seem to be a tempting alternative as substances that limit and inhibit the growth and development of pathogens (Van Moll et al., 2022; Table 3). In addition to direct antimicrobial activity, AMPs inhibit biofilm formation and destabilize biofilm structures (Saeed et al., 2022). The experiment carried out by Scieuzo et al. (2023) allowed for the recognition of 33 HI-derived AMPs in all samples analyzed, 13 of which are specifically stimulated by Gram-negative and/or Gram-positive bacteria. An important note is that the expression of some AMPs can be induced upon stimulation by specific bacteria. Thus, both *E. coli* and *M. flavus* induced the expression of six AMPs (defensin, attacin, and cysteine-rich peptide), while defensin was induced specifically by *E. coli*, and cecropins and de-

fensins were induced by *M. flavus*. The most frequently detected AMPs included defensins. Lee et al. (2020) conducted a study to determine the antimicrobial activity of HI larvae extract immunized with *Lactobacillus* against *Salmonella* species. HI larvae were inoculated with five *Lactobacillus* species (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, and *L. delbrueckii*). This treatment was designed to activate the larvae's natural innate immune system. Hemolymph was isolated from the larvae and evaluated for antimicrobial activity against three *Salmonella* species (*Salmonella pullorum*, *Salmonella Typhimurium*, and *Salmonella Enteritidis*). The hemolymph of HI larvae immunized with *L. casei* showed the highest antimicrobial activity, and the hemolymph extract of these larvae prevented the growth of *Salmonella* species. It was also found that there were changes in antimicrobial activity depending on the time elapsed after infection with *L. casei*. In addition, the expression of cecropin-1 and

defensin-1 genes peaked after 24 hours. Importantly, the antimicrobial activity in the hemolymph was resistant to high temperatures and a wide pH range. The antimicrobial activity of the extract on *E. coli* (Gram-negative bacteria) and *S. aureus* (Gram-positive bacteria) was also investigated. It was determined that the MIC was 100–200 µg/100 µl for both bacteria. The experiment also showed the absence of cytotoxic effects on CaCo-2 (human intestinal cell lines) and L929 (mouse fibroblast cell lines) cells at extract concentrations of 100 to 4000 µg/100 µl or 100 to 2000 µg/100 µl, respectively. This information is very important, as it shows that the extract can be considered as an antimicrobial treatment safe for humans and animals. Vogel et al. (2018) evaluated the effect of diet in combination with the developmental stage of the larvae on the expression of immunity-related genes. The larvae were fed an unsupplemented feed (standard) and one supplemented with lignin, cellulose, chitin, brewer's grains, and sunflower oil. A mixed diet was also prepared with cellulose, chitin, lignin, brewer's grains, and sunflower oil, as well as a mixture of food waste (50% of the aforementioned plants and meat mixture). To induce an immune response, bacteria were added to the diet. Standard plate inhibition zone tests were performed with the bacterial species *Escherichia coli* BL21 (DE3), *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescens* BL915, and *Bacillus subtilis* using extracts from previously cultured HI larvae. The highest number of genes with significantly differential expression compared to the standard diet was observed in the high-protein diet, followed by the vegetable oil diet, while the lowest number was observed in larvae receiving cellulose supplementation. Interestingly, larvae fed a diet supplemented with vegetable oil showed the strongest overall induction of immunity-related genes. The study found that diet during rearing had a significant effect on the antimicrobial activity of larvae extracts. The efficiency of HI larvae extracts depends on the diet and the solvent used to make the extract. In the case of aqueous extracts, the strongest inhibitory activity against Gram-negative bacteria was observed for high-protein and cellulose cultures, while the inhibitory activity against Gram-positive bacteria was highest for larvae reared on diets with chitin, cellulose, bacteria, and vegetable oil. In contrast, chloroform extracts showed the highest activity against all bacterial species when the larvae were reared on diets supplemented with lignin, bacteria, and vegetable oil. In a study by Choi et al. (2012), larvae were extracted with various organic solvents (methanol, ethanol, chloroform, n-hexane), and their antimicrobial activity was determined by agar disc diffusion and turbidometric tests. The tests showed that the antibacterial effect of the methanol extract was detected only in Gram-negative bacteria (*K. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, and *S. sonnei*). The antibacterial effect was not induced in Gram-positive bacteria such as *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* or *Sarcina lutea*. The other extracts did not show antimicro-

bial activity against the Gram-positive and Gram-negative bacteria tested. Methanol extract-treated bacteria growth was strongly inhibited from 20 mg/ml in a dose-dependent manner compared to other extracts, and the antibacterial activity gradually decreased after 24 hours. The minimum inhibitory concentration of the methanol extract against *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Shigella sonnei* for 12 hours was 44.74 mg/ml, 43.98 mg/ml, and 43.96 mg/ml, respectively. Based on the results, the methanolic extract was found to have antimicrobial activity to reduce bacterial proliferation in a dose-dependent manner. In addition, the methanolic extract of HI larvae was proven to have properties that effectively block the viability of bacteria. To test the antimicrobial activity of 36 AMP HI libraries, a screening study (Van Moll et al., 2022) was conducted against a Gram-positive bacterium (*S. aureus*), two Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*), two fungal species (*C. albicans* and *A. fumigatus*). The MRC5-SV2 cell line of human embryonic lung fibroblasts was used to evaluate the toxicity of the peptides. Most of the tested antimicrobial peptides did not affect cell viability in the concentration ranges tested. For Hill-Knot2, a knottin-like peptide, Hill-Stom1, a stomoxyn-like peptide, and Hill-Dip6, a diptericin, IC₅₀ values below 32 µM were registered for cell toxicity. The highest antimicrobial activity was found within the AMP family of cecropins. All cecropins (except Hill-Cec6) showed activity against *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* with MIC ranging from 0.50 µM to 2 µM. Hill-Dip6 showed activity against *E. coli* at a MIC of 2 µM, but no activity was registered against *P. aeruginosa*. Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* was noted for the defensins Hill-Def2a, Hill-Def2b, and Hill-Def4. In the concentration ranges tested, no peptide showed signs of activity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*. Due to their high antimicrobial activity, Hill-Cec1 and Hill-Cec10 were further tested on an expanded panel of microorganisms. Based on the assays, the cecropins were found to be active against *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* LMG 27650 and *P. aeruginosa* ATCC 15442 and *P. aeruginosa* ATCC 9027. In addition, Hill-Cec1 and Hill-Cec10 were highly active against *K. pneumoniae* (Table 2). No activity was found against *Burkholderia cenocepacia* and *Mycobacterium tuberculosis* in this concentration range. Both peptides showed concentration-dependent inhibition of *P. aeruginosa* ATCC 15442 biofilm formation. No activity was found against *Burkholderia cenocepacia* or *Mycobacterium tuberculosis* in the concentration range. Both peptides showed concentration-dependent inhibition of *P. aeruginosa* ATCC 15442 biofilm formation. For Hill-Cec1, a statistically significant decrease in biofilm mass and viability occurred at a lower concentration than for Hill-Cec10. A test performed on erythrocytes showed that both cecropins exhibited hemolysis of less than 10% at the highest concentration tested, 64 µM.

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) values for the cecropins analyzed (Van Moll et al., 2022)

Strain	MIC	
	Hill-Cec1	Hill-Cec10
<i>P. aeruginosa</i> PAO1	0.5–1 µM	2–8 µM
<i>P. aeruginosa</i> LMG 27650	1–2 µM	4–8 µM
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	1 µM	4 µM
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.5–1 µM	1–2 µM
<i>K. pneumoniae</i>	0.25–0.5 µM	0.5–1 µM

The two peptides, DLP2 and DLP4 (Li et al., 2017), identified and isolated from HI were evaluated for antimicrobial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus suis* and *Listeria ivanovii*. Importantly, 30-day serial passaging of MRSA in the presence of DLP2/DLP4 did not produce resistant mutants. Macromolecular synthesis showed that DLP2/DLP4 inhibits multi-molecular synthesis, primarily of RNA. The results of flow cytometry and electron microscopy determined that the cell cycle was interrupted in the R phase due to disruption of the cytoplasmic membrane and cell wall by the AMPs tested. Mesosome-like structures were visualized in MRSA. The MICs of DLP4 were 2 to 4 times higher than those of DLP2, indicating stronger DLP2 activity. MIC values for *Staphylococcus* varied by species for DLP2 from 0.01 to 0.023 µM and for DLP4 from 0.01 to 0.47 µM. The cytotoxicity of DLP2 and DLP4 was checked using mouse erythrocytes and peritoneal macrophages of RAW264.7 cells, and the results showed that DLP2 and DLP4 had no significant hemolytic activity. The thermal stability of DLP2 and DLP4 was also evaluated after a 1 h incubation of 25 µl of the peptide solution at increasing temperatures. DLP2 and DLP4 showed high thermal stability. Park and Yoe (2017) evaluated the activity of DLP3 against *Escherichia coli* (KCCM 11234), *Pseudomonas aeruginosa* (KCCM 11328), MRSA, *Staphylococcus aureus* (KCCM 40881, KCCM 12256), and *Staphylococcus epidermidis* (KCCM 35494). Sterile cell culture plates containing logarithmic phase cells of the different bacterial strains were treated with sequential dilutions of DLP3. The MIC of DLP3 against the tested strains was calculated. Thus, MICs for MRSA, *S. aureus* 40881, *S. aureus* 12256, *S. epidermidis*, *E. coli* and *P. aeruginosa* were determined to be 5, 5, 10, 10, 10 and 40 µg/mL, respectively. The inhibitory effect of DLP3 against MRSA is significant. Moreover, the experiment proved that DLP3 can serve as a weapon against both Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria. Another study by Park et al. (2015) tested the minimum inhibitory concentration of DLP4 against *Escherichia coli* (KCCM 11234), *Enterobacter aerogenes* (KCCM 12177), *Pseudomonas aeruginosa* (KCCM 11328), MRSA, *Staphylococcus aureus* (KCCM 40881, KCCM 12256), *Bacillus subtilis* (KCCM 11316) and *Staphylococcus epidermidis* (KCCM 35494). Antimicrobial activity of the hemolymph and HI chromatographic fractions against *E. coli* and MRSA

was measured using the zone of inhibition test. Activity against other bacteria was tested on cell culture plates. MICs of DLP4 against MRSA (0.59–1.17 µM), *S. aureus* 40881 (0.59–1.17 µM), *S. aureus* 12256 (1.17–2.34 µM), *S. epidermidis* (0.59–1.17 µM) and *Bacillus subtilis* (0.02–0.04 µM) were determined from the tests. It was determined that DLP4 showed high activity against Gram-positive bacteria. However, no antimicrobial activity was observed against Gram-negative bacteria. The antimicrobial activity of TRX-Hidefensin1-1 fusion protein was evaluated by analyzing the minimum inhibitory concentration against Gram-positive (*S. aureus*) and Gram-negative (*E. coli* and *Salmonella* spp.) bacteria (Zhang et al., 2022). Bacteria were cultured to the logarithmic middle phase. As standard, TRX-Hidefensin1-1 peptide was serially diluted and then placed in a 96-well plate and mixed with a 1% suspension of bacteria. Recombinant TRX-Hidefensin1-1 exhibited significant inhibitory activity against *E. coli* (MIC = 30–60 µg/ml) and *S. aureus* (MIC = 15–30 µg/ml) but was less active against *Salmonella* spp. (MIC > 100 µg/ml). The antimicrobial activity of stomoxynZH1 against the Gram-positive bacteria *S. aureus*, the Gram-negative bacteria *E. coli*, the fungus *R. solani* Khün (rice)-10 and the fungus *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary-14 was determined (Elhag et al., 2017). Bacterial strains were seeded onto Mueller-Hinton plates, and the pathogenic fungal block was inoculated onto agar plates. Inhibition zone and MIC tests were performed. Trx-stomoxynZH1 exhibited a strong inhibitory effect on *S. aureus* (27–54 µg/ml) and *E. coli* (15–30 µg/ml) bacteria. In addition, it induced strong antimicrobial activity against the fungi *R. solani* Khün (rice)-10 and *S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary-14 (for both > 98 µg/ml). The study by Shin and Park (2019) contributed to the investigation of the antimicrobial activity of rHI-attacin against *Escherichia coli* (KCCM 11234) and *Staphylococcus aureus* (KCCM 40881: MRSA). For this purpose, an inhibition zone test was performed. The rHI-attacin showed antibacterial activity against *E. coli* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA).

Hermetia illucens larvae meal as a potential feed supplement – *in vivo* studies

Due to the high market demand for food of animal origin (Xia et al., 2021), there is an increasing interest in materials suitable for livestock feeding, to improve both the animal's production efficiency and health status. The limited amount of agricultural land and competition for protein sources among human food, pet food, and livestock feeds drives the search for new methods of protein production (Hong et al., 2020). Production of insects is environmentally friendly and shows a small ecological footprint and high growth and reproduction rates (Reátegui et al., 2020), while insects, as poikilotherms, do not need to maintain their body temperature, which allows for higher feed conversion efficiencies in comparison to homeothermic farm animals (Oonincx et al., 2011). Among others, *Hermetia illucens* is the most eco-

nominally profitable species as a farm insect, due to flexibility in terms of adaptation to the rearing substrate (pre-consumer wastes), favorable nutritive value, and short-term production (Kierończyk et al., 2022). HI dried meals appear to be good feed materials due to their high nutritional values, and depending on the technological process and defatting degree, they exhibit a high protein (42–56%), fat (7–28%), crude fiber (9–12%), and mineral content (Grela and Skomiał, 2020). In the fatty acid profile of HI meal, lauric acid should be mentioned, which is known for its antibacterial properties (Matsue et al., 2019) and very high absorption efficiency when transferred to the liver to be used as a source of energy administered to animal diets. *H. illucens* larvae also contain bacteriostatic substances such as chitin, which is a naturally occurring polysaccharide of the arthropod exoskeleton (Waśko et al., 2016). Of note and at the center of our interest in this publication are AMPs, which are bioconservative molecules (Zhang and Gallo, 2016) that constitute a major defense mechanism in insects and increase their resistance to bacterial infections (Hoffmann and Hetru, 1992). From this perspective, insect meal AMPs appear to be an enticing option in veterinary medicine as potential replacements for antibiotics that have been administered in large quantities and for long periods (Looft et al., 2012; Elhag et al., 2017). Similar conclusions were reached by Gul and Alsayeqh (2022). Long-term use of antibiotics has led to the emergence of superbugs in poultry rearing. The overuse of antibiotics in poultry has resulted in a real threat to humans. The possibility of transmitting antibiotic-resistant *E. faecalis* to human pathogenic *S. aureus* via horizontal gene transfer has been detected (Malik et al., 2022). The study conducted by Looft et al. (2012) on pigs showed that even a low dose of antibiotics administered for a short time in the feed increases the abundance and diversity of antibiotic resistance genes, including resistance to non-administered antibiotics, and increases the abundance of *E. coli*. A study was conducted (Li et al., 2017) in which six-week-old female mice were used to create a mouse model of peritonitis or sepsis. The effect was achieved by intraperitoneal injection of MRSA. Two doses of DLP2 and DLP4 (3, 5, and 7.5 mg/kg body weight, 0.3 ml) were then injected intraperitoneally. Application of doses of 3, 5 and 7.5 mg/kg body weight of DLP2, DLP4 protected mice from lethal MRSA challenge and inhibited the inflammatory response, while the survival rate of treated mice was 80%, 100%, and 100%, respectively. Furthermore, DLP2 and DLP4 reduced the bacterial translocation burden in the spleen and kidney by more than 95%, decreased the level of serum pro-inflammatory cytokines, increased the level of anti-inflammatory cytokines, and alleviated lung and spleen damage. The results indicate that DLP2 and DLP4 may be helpful against staphylococcal infections. Yu et al. (2019) investigated the effect of *H. illucens* larvae meal administration on colon microflora and bacterial metabolite production in pigs. For this purpose, 72 animals were divided into three groups,

where one was the control group and two received the HI larvae meal in a feed mixture – 4% and 8%, respectively. From the results collected, it was shown that the group receiving the 4% HI larvae meal supplement had significantly increased numbers of *Lactobacillus* and the butyrate-producing bacteria *Pseudobutyribacterio*, *Roseburia*, and *Faecalibacterium*, increased short chain fatty acids (SCFAs), anti-inflammatory cytokines, and intestinal barrier gene expression in the colon. On the other hand, a 4% addition of meal decreased *Streptococcus* abundance, the concentration of nitrogenous fermentation products (cadaverine, tryptamine, phenol, p-cresol, and scatol), and the pro-expression of inflammatory cytokine genes. In contrast, 8% addition of HI meal did not induce beneficial effects on colon microflora in pigs. An experiment was conducted (Spranghers et al., 2018) to evaluate the effects of diets containing full-fat (4 and 8%) and defatted (5.4%) HI prepupae meals on health indicators of weaned piglets. The effect of HI fat on pig intestinal microflora *in vitro* was also tested by simulating digestion in the upper small intestine of piglets. Intestinal microflora was collected from one donor piglet and used as inoculum in an incubation medium after appropriate preparation. After incubation, bacteria were counted using a selective medium according to the ring plate technique. No reduction in the number of coliforms and total anaerobic bacteria was shown, but inhibition of lactic acid bacilli and D streptococci was observed. Based on the results of the animal portion of the experiment, it was noted that the inclusion of defatted HI meal resulted in equal or higher intestinal digestibility of nutrients compared to the no HI meal supplement group, while the use of full-fat HI meal decreased intestinal digestibility of energy. Thus, it was concluded that a significant amount of soy products can be substituted with defatted HI without adversely affecting performance. Biasato et al. (2020) studied the effect of HI meal in the diet on the intestinal microflora and intestinal mucin composition of broiler chickens. In the experiment, 256 one-day-old male broiler chickens (Ross 708) were used and divided into groups: the control diet was based on corn meal, corn gluten meal, and soybean meal, while the experimental diets contained 5%, 10%, and 15% partially defatted HI larvae meal. The cecal microbiota of birds fed the control diet or the HI-supplemented diet in this study was colonized mainly by *Clostridiales*, members of the genera *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium*, and *Oscillospira*, and the family *Lachnospiraceae*. Based on the results, the inclusion of HI meal in the diet was shown to modulate both cecal microflora and intestinal mucin composition of broiler chickens. It was demonstrated that the dynamics of intestinal microflora or intestinal mucin in terms of maintenance of physiological microbial populations, selection of potentially beneficial bacteria, and growth of villi mucins were positively affected by a diet with 5% HI meal addition. However, the addition of as much as 15% adversely affected the partial reduction of microbial complexity, reduction of potentially beneficial

bacteria, selection of bacteria with mucolytic activity, and reduction of villi mucins. Thus, it can be assumed that a 5% addition of HI meal has a beneficial effect on the intestinal health status of broiler chickens. Józefiak et al. (2018) noticed the most significant effect on the microbiota populations in the crop, ileum, and caeca of 400-day-old female ROSS 308 chickens fed a diet supplemented with 0.2% of HI meal, in comparison to other tested insect meals and the control group. HI supplementation decreased the abundance of the *Clostridium leptum* subgroup and increased that of the *Clostridium coccoides* – *Eubacterium rectale* cluster. Furthermore, in the HI-supplemented group, the highest proportion of *Lactobacillus* spp./*Enterococcus* spp. was noted. In a study by Szczepanik et al. (2023), a supplement of 2.5 and 5% HI meal was administered to weaned piglets. The supplement was not found to impair weight gain or adversely affect organ weights. The results indicate that the use of HI insect meal did not adversely affect the health status of weaned piglets as confirmed by biochemical and hematological blood tests. However, it was noted that the addition of 5% reduced the level of hemoglobin in the blood (it remained within physiological norms) which is an unfavorable phenomenon. Tang et al. (2022) conducted an experiment on 72 weaned pigs that were divided into three groups: a basal diet (negative control), a diet supplemented with zinc oxide (positive control), and a diet supplemented with HI larvae meal (100% fish meal replacement) for 28 days in the presence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC K88). Based on histological analyses, an increase in the villi height of the jejunum and the ratio of villi height to crypt depth (V/C) of pigs in the HI group was noted compared to the other groups. In addition, there was a decrease in the depth of jejunal crypts in the HI group compared to the negative control. Moreover, the meal diet decreased the incidence of diarrhea from day 1 to day 28 and increased the expression of claudin-1, occludin, MUC-1 and MUC-2, cup cell count, and secretory immunoglobulin A (sIgA) concentration in the intestine of weaned pigs. Compared to the negative

control, HI decreased the expression of IL-1 β and IL-8 and increased the levels of IL-10, TGF- β , pBD1, pBD2, and PG1-5 in the jejunum and ileum, as well as significantly decreasing TLR2 level, p-NF- κ B, and p-MAPK expression and increasing SIRT1 expression in the ileum. In the HI group, increased HDAC3 expression and acH3k27 acetylation were noted in the ileum. In addition, HI positively affected the composition and diversity of intestinal microflora and increased butyrate and valerate concentrations and valerate/propionate ratio in pigs. Based on the study, it was concluded that a diet with HI larvae meal improved the health of pigs by decreasing the incidence of diarrhea and having a beneficial effect on intestinal microbiota. Moreover, HI larvae meal regulated the expression of intestinal cytokines through the TLR2-NF- κ B/MAKP signaling pathway and promoted the modification of histone acetylation by increasing SIRT1 expression and decreasing HDAC3 expression, regulating AMP expression. The objective of the study by Marono et al. (2017) was to investigate the effect of replacing soybean meal with HI larvae meal on the productive performance and blood profiles of laying hens aged 24 to 45 weeks. From the results collected, it was found that hens fed HI larvae meal had a better feed conversion ratio. In addition, globulin levels were higher in hens fed the HI meal, and the reverse was true for the albumin/globulin ratio. In contrast, cholesterol and triglyceride levels were higher in hens fed soybean meal. In a study by Loponte et al. (2017), Berber partridges were fed two insect meals to replace soya. The results indicated that the albumin/globulin ratio was higher in the control group than in the insect meal groups. Similarly, a study by Bovera et al. (2018) on laying hens showed that the albumin/globulin ratio decreased with the highest insect content. The beneficial effect of HI here was attributed to the chitin content (Bovera et al., 2018). Blood Ca levels were higher in hens fed insect meal. High globulin concentration and low albumin/globulin ratio indicate better disease resistance and immune response in birds (Griminger and Scanes, 1986).

Table 3. The minimal concentration of AMPs in *Hermetia illucens* extracts revealing the inhibitory activity on bacterial and fungal growth – a summary

AMP	Strength of activity (MIC)		References
	1	2	
DLP2			Li et al., 2017
	Gram-negative bacteria		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0.01 μ M	
	<i>S. aureus</i> ATCC43300	0.12 μ M	
	<i>S. aureus</i> ATCC6538	0.12 μ M	
	<i>S. aureus</i> CICC546	0.23 μ M	
	<i>Streptococcus suis</i> CVCC606	0.93 μ M	
	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC19119	0.12 μ M	
	Gram-negative bacteria		
	<i>Escherichia coli</i> CVCC1515	>29.97 μ M	
	<i>E. coli</i> CICC21530 (serotype O157:H7)	>29.97 μ M	
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	>29.97 μ M	
	<i>S. enteritidis</i> CMCC50336	>29.97 μ M	

Table 3. – contd.

1	2	3
DLP4		Li et al., 2017
	Gram-negative bacteria	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	0.01 µM
	<i>S. aureus</i> ATCC43300	0.23 µM
	<i>S. aureus</i> ATCC6538	0.47 µM
	<i>S. aureus</i> CICC546	0.47 µM
	<i>Streptococcus suis</i> CVCC606	1.88 µM
	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC19119	0.12 µM
	Gram-negative bacteria	
	<i>Escherichia coli</i> CVCC1515	>29.98 µM
	<i>E. coli</i> CICC21530 (serotype O157:H7)	>29.98 µM
	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC14028	>29.98 µM
	<i>S. enteritidis</i> CMCC50336	>29.98 µM
	Gram-positive bacteria	
	MRSA	0.59–1.17 µM
	<i>S. aureus</i> KCCM 40881	0.59–1.17 µM
	<i>S. aureus</i> KCCM 12256	1.17–2.34 µM
	<i>S. epidermidis</i> KCCM 35494	0.59–1.17 µM
	<i>B. subtilis</i> KCCM 11316	0.02–0.04 µM
	Gram-negative bacteria	
	<i>E. coli</i> KCCM 11234	Non detected
	<i>E. aerogenes</i> KCCM 12177	Non detected
	<i>P. aeruginosa</i> KCCM 11328	Non detected
DLP3	Gram-positive bacteria	Park and You, 2017
	MRSA	5 µg/ml
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 40881	5 µg/ml
	<i>S. aureus</i> KCCM 12256	10 µg/ml
	<i>S. epidermidis</i> KCCM 35494	10 µg/ml
	Gram-negative bacteria	
	<i>Escherichia coli</i> KCCM 11234	10 µg/ml
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCCM 11328	40 µg/ml
TRX-Hidefensin1-1	Gram-positive bacteria	Zhang et al., 2022
	<i>S. aureus</i>	
	Gram-negative bacteria	
	<i>E. coli</i>	30–60 µg/ml
	<i>Salmonella</i> spp.	>100 µg/ml
Trx-stomoxynZH1	Gram-positive bacteria	Elhag et al., 2017
	<i>S. aureus</i>	27–54 µg/ml
	Gram-negative bacteria	
	<i>E. coli</i>	15–30 µg/ml
	Fungi	
	<i>Rhizoctonia solani</i> Khün (rice)-10	>98 µg/ml
	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary-14	>98 µg/ml
HI-attacin	Gram-positive bacteria	Shin et al., 2019
	<i>S. aureus</i> (KCCM 40881; MRSA)	No MIC given
	Gram-negative bacteria	No MIC given
	<i>E. coli</i> (KCCM 11234)	
Hill-Cec1	Gram-positive bacteria	Van Moll et al., 2022
	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177 (H37Ra)	>32 µM
	Gram-negative bacteria	
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	0.25–0.5 µM
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	0.5–1 µM
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692 (PAO1)	0.5–1 µM
	<i>P. aeruginosa</i> LMG 27650 (MDR)	1–2 µM
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	1 µM
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	0.25–0.5 µM
	<i>B. cenocepacia</i> LMG 16656	>32 µM
Hill-Cec10	Gram-positive bacteria	Van Moll et al., 2022
	<i>M. tuberculosis</i> ATCC 25177 (H37Ra)	>32 µM
	Gram-negative bacteria	
	<i>E. coli</i> ATCC 8739	1 µM
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	1–2 µM
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15692 (PAO1)	2–8 µM
	<i>P. aeruginosa</i> LMG 27650 (MDR)	4–8 µM
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	4 µM
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	0.5–1 µM
	<i>B. cenocepacia</i> LMG 16656	>32 µM

Table 3. – contd.

1	2	3
Hill_BB_C6571	Gram-negative bacteria <i>E. coli</i>	No MIC given Moretta et al., 2020
Hill_BB_C16 34	Gram-negative bacteria <i>E. coli</i>	No MIC given Moretta et al., 2020
Hill_BB_C46948	Gram-negative bacteria <i>E. coli</i>	No MIC given Moretta et al., 2020
Hill_BB_C7985	Gram-negative bacteria <i>E. coli</i>	No MIC given Moretta et al., 2020
Hidefensin-1 (HiOGS11078)	Gram-negative bacteria <i>E. coli</i>	No MIC given Xu et al., 2020
HiCG13551 (HiO S03714)	Gram-positive bacteria <i>S. aureus</i> <i>S. pneumoniae</i> Gram-negative bacteria <i>E. coli</i>	No MIC given Xu et al., 2020 No MIC given No MIC given
Hidiptericin-1	Gram-positive bacteria <i>S. pneumoniae</i> Gram-negative bacteria <i>E. coli</i>	No MIC given Xu et al., 2020 No MIC given

Conclusions

Antimicrobial peptides exhibit activity against many bacterial and fungal species and induce osmotic lysis of protozoa while, importantly, not threatening host cells. Antimicrobial peptides have been isolated and described from many organisms, but AMPs from insects, especially *Hermetia illucens*, were the focus of this review. The structures of AMPs are heterogeneous, but their mechanism of action is similar and involves the destruction of the bacterial cell membrane. Mechanisms of cell membrane lysis can be divided into four main models: toroidal pore model, carpet-like model, barrel-stave model, and aggregate model. Among the best-studied AMPs derived from *Hermetia illucens* are peptides from the attacin, cecropin, and defensin groups. Studies performed over the past few years report that the antibacterial effects of *Hermetia* larvae extracts are influenced by diet and the type of solvent used to make the extract. Both *in vitro* and *in vivo* studies indicate that AMPs appear to be a tempting alternative as substances that limit and inhibit the growth and development of pathogens. Due to the increasing antibiotic resistance of pathogenic bacteria, the potential antimicrobial effects of additives from *Hermetia illucens* have begun to be investigated. According to the obtained research results, the AMPs can be an option in veterinary medicine as potential substitutes for antibiotics, the administration of which must be limited in the European Union. The prospects for application in practice are good. Beside the animal's health status, HI meals have the potential to also improve growth performance and to reduce the incidence of diarrhea. What is more, studies on piglets and broilers show that beneficial health effects are already visible at low levels of HI meal addition, and high contents of this product in the diet are not needed. However, HI meal costs remain prohibitively high. It is not by chance that the AMPs from *Hermetia*

illucens were discussed here – this is the most economically profitable species as a farm insect, due to flexibility in terms of adaptation to the rearing substrate (preconsumer wastes) and short-term production. It seems that, apart from further scientific research, work on increasing the scale of HI meal production and lowering its price is necessary for greater use of this product in farm animal practice.

References

- Antimicrobial Peptide Database <https://aps.unmc.edu/>
- Biasato I., Ferrocino I., Dabbou S., Evangelista R., Gai F., Gasco L., Cocolin L., Capucchio M. T., Schiavone A. (2020). Black soldier fly and gut health in broiler chickens: insights into the relationship between cecal microbiota and intestinal mucin composition. J. Anim. Sci. Biotechnol., 11: 1–12.
- Bovera F., Loponte R., Pero M. E., Cutrignelli M. I., Calabro S., Musco N., Vassalotti G., Panettieri V., Pietro Lombardi P., Piccolo G., Di Meo C., Siddi G., Fliegerova K., Moniello G. (2018). Laying performance, blood profiles, nutrient digestibility and inner organs traits of hens fed an insect meal from *Hermetia illucens* larvae. Res. Vet. Sci., 120: 86–93.
- Bulet P., Stocklin R. (2005). Insect antimicrobial peptides: structures, properties and gene regulation. Protein Pept. Lett., 12: 3–11.
- Bulet P., Hetru C., Dimarcq J. L., Hoffmann D. (1999). Antimicrobial peptides in insects; structure and function. Dev. Comp. Immunol., 23: 329–344.
- Buonocore F., Fausto A.M., Della Pelle G., Roncevic T., Gerdol M., Picchietti S. (2021). Attacins: A promising class of insect antimicrobial peptides. Antibiotics, 10: 212.
- Carlsson A., Nyström T., de Cock H., Bennich H. (1998). Attacins – an insect immune protein-binds LPS and triggers the specific inhibition of bacterial outer-membrane protein synthesis. Microbiology, 144: 2179–2188.
- Choi W.H., Yu, J.H., Chu J.P., Chu K.B. (2012). Antibacterial effect of extracts of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae against gram-negative bacteria. Entomol. Res., 42: 219–226.
- Ebenhan T., Gheysens O., Kruger H.G., Zeevaart J.R., Sathenge M.M. (2014). Antimicrobial peptides: their role as infection-selective tracers for molecular imaging. Biomed. Res. Int., 2014.

- Elhag O., Zho D., Song Q., Soomro A.A., Cai M., Zheng L., Yu Z., Zhang J. (2017). Screening, expression, purification, and functional characterization of novel antimicrobial peptide genes from *Hermetia illucens* (L.). PLoS One, 12: e0169582.
- Ganz T., Lehrer R.I. (1995). Defensins. Pharmacol. Therapeut., 66: 191–205.
- Grela E.R., Skomiał J. (2020). Zalecenia żywieniowe i wartość pokarmowa pasz dla świń (in Polish). The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Polish Academy of Sciences, Jabłonna, Poland.
- Griminger P., Scanes C.G. (1986). Protein metabolism. In: Avian Physiology, Sturkie, P.D. (ed.). Springer, New York, NY, pp. 326–344.
- Gul S.T., Alsayeqh A.F. (2022). Probiotics as an alternative approach to antibiotics for safe poultry meat production. Pak. Vet. J., 42: 285–291.
- Hoffmann J.A., Hetru C. (1992). Insect defensins: inducible antibacterial peptides. Immunol. Today, 13: 411–415.
- Hong Y., Zhou J., Yuan M.M., Dong H., Cheng G.Q., Wang Y.J., Xia J.Y., Zhang L. (2020). Dietary supplementation with housefly (*Musca domestica*) maggot meal in growing beagles: hematology, serum biochemistry, immune responses, and oxidative damage. Ann. Anim. Sci., 20: 1351–1364.
- Józefiak A., Engberg R.M. (2017). Insect proteins as a potential source of antimicrobial peptides in livestock production. A review. J. Anim. Feed Sci., 26: 87–99.
- Józefiak A., Kierończyk B., Rawski M., Mazurkiewicz J., Benzerthi A., Gobbi P., Nogales-Mérida S., Świątkiewicz S., Józefiak D. (2018). Full-fat insect meals as feed additive – the effect on broiler chicken growth performance and gastrointestinal tract microbiota. J. Anim. Feed Sci., 27: 131–139.
- Kierończyk B., Rawski M., Mikolajczak Z., Leciejewska N., Józefiak D. (2022). *Hermetia illucens* fat affects the gastrointestinal tract selected microbial populations, their activity, and the immune status of broiler chickens. Ann. Anim. Sci., 22: 663–675.
- Lai Y., Gallo R.L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol., 30: 131–141.
- Langen G., Imani J., Altincicek B., Kieseritzky G., Kogel K.H., Vilcinskas A. (2006). Transgenic expression of gallerimycin, a novel antifungal insect defensin from the greater wax moth *Galleria mellonella*, confers resistance to pathogenic fungi in tobacco. Biol. Chem., 387: 549–557.
- Lata S., Sharma B.K., Raghava G.P. (2007). Analysis and prediction of antibacterial peptides. BMC Bioinform., 8: 1–10.
- Lee K.S., Yun E.Y., Goo T.W. (2020). Antimicrobial activity of an extract of *Hermetia illucens* larvae immunized with *Lactobacillus casei* against *Salmonella* species. Insects, 11: 704.
- Li B., Yang N., Wang X., Hao Y., Mao R., Li Z., Wang Z., Teng D., Wang J. (2020). An enhanced variant designed from DLP4 cationic peptide against *Staphylococcus aureus* CVCC 546. Front Microbiol., 11: 1057.
- Li Z., Mao R., Teng D., Hao Y., Chen H., Wang X., Wang X., Jang N., Wang J. (2017). Antibacterial and immunomodulatory activities of insect defensins-DLP2 and DLP4 against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. Sci. Rep., 7: 1–16.
- Looft T., Johnson T.A., Allen H.K., Bayles D.O., Alt D.P., Stedtfeld R.D., Sul W.J., Stedtfeld T.M., Chai B., Cole J.R., Hashsham S.A., Tiedje J.M., Stanton, T.B. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 109: 1691–1696.
- Loponte R., Nizza S., Bovera F., De Riu N., Fliegerova K., Lombardi P., Vassalotti G., Vincenzo Mastellone V., Moniello G. (2017). Growth performance, blood profiles and carcass traits of Barbary partridge (*Alectoris barbara*) fed two different insect larvae meals (*Tenebrio molitor* and *Hermetia illucens*). Res. Vet. Sci., 115: 183–188.
- Makwana P., Rahul K., Ito K., Subhadra B. (2023). Diversity of antimicrobial peptides in silkworm. Life, 13: 1161.
- Malik F., Nawaz M., Anjum A.A., Firyal S., Shahid M.A., Irfan S., Ahmed F., Bhatti A.A. (2022). Molecular characterization of antibiotic resistance in poultry gut origin enterococci and horizontal gene transfer of antibiotic resistance to *Staphylococcus aureus*. Pak. Vet. J., 42: 383–389.
- Marono S., Loponte R., Lombardi P., Vassalotti G., Pero M.E., Russ F., Gasco L., Parisi G., Piccolo G., Nizza S., Meo C. Di, Attia Y.A., Bovera F. (2017). Productive performance and blood profiles of laying hens fed *Hermetia illucens* larvae meal as total replacement of soybean meal from 24 to 45 weeks of age. Poultry Sci., 96: 1783–1790.
- Matsue M., Mori Y., Nagase S., Sugiyama Y., Hirano R., Ogai K., Ogora K., Kurihara S., Okamoto S. (2019). Measuring the antimicrobial activity of lauric acid against various bacteria in human gut microbiota using a new method. Cell Transplant., 28: 1528–1541.
- Moore A.J., Devine D.A., Bibby M.C. (1994). Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. Peptide Res., 7: 265–269.
- Moretta A., Salvia R., Scieuza C., Di Somma A., Vogel H., Pucci P., Sgambato A., Wolff M., Falabella P. (2020). A bioinformatic study of antimicrobial peptides identified in the Black Soldier Fly (HS) *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). Sci. Rep., 10: 1–14.
- Müller A., Wolf D., Gutzeit H.O. (2017). The black soldier fly, *Hermetia illucens* – a promising source for sustainable production of proteins, lipids and bioactive substances. Z. Naturforsch. C J. Biosci., 72: 351–363.
- Mylonakis E., Podsiadlowski L., Muhammed M., Vilcinskas A. (2016). Diversity, evolution and medical applications of insect antimicrobial peptides. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci., 371: 20150290.
- Oninex D.G.A.B., van Lterbeek J., Heetkamp M.J.W., van den Brand H., van Loon J.J.A., van Huis A. (2011). An exploration on greenhouse gas and ammonia production by insect species suitable for animal or human consumption. Plos ONE, 5: e14445.
- Park S.I., Yoe S.M. (2017 a). A novel cecropin-like peptide from black soldier fly, *Hermetia illucens*: Isolation, structural and functional characterization. Entomol. Res., 47: 115–124.
- Park S.I., Yoe S.M. (2017 b). Defensin-like peptide3 from black soldier fly: Identification, characterization, and key amino acids for anti-Gram-negative bacteria. Entomol. Res., 47: 41–47.
- Park S.I., Kim J.W., Yoe S.M. (2015). Purification and characterization of a novel antibacterial peptide from black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. Dev. Comp. Immunol., 52: 98–106.
- Reátegui J., Barriga X., Obando A., Moscoso G., Manrique P., Salazar I. (2020). *Hermetia illucens* larva (Diptera: Stratiomyidae) meal as a protein ingredient for partial replacement of soybean meal in the feed of *Cavia porcellus* (guinea pig): effect on the consumption, weight gain, and feed conversion. Sci. Agropecu., 11: 513–519.
- Saeed S.I., Mergani A., Akliu E., Kamaruzzaman N.F. (2022). Antimicrobial peptides: bringing solution to the rising threats of antimicrobial resistance in livestock. Front. Vet. Sci., 9: 319.
- Scieuza C., Giglio F., Rinaldi R., Lekka M.E., Cozzolino F., Monaco V., Monti M., Salvia R., Falabella P. (2023). *In vitro* evaluation of the antibacterial activity of the peptide fractions extracted from the hemolymph of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). Insects, 14: 464.
- Shin H.S., Park S.I. (2019). Novel attacin from *Hermetia illucens*: cDNA cloning, characterization, and antibacterial properties. Prep. Biochem. Biotechnol., 49: 279–285.
- Spranghers T., Michiels J., Vrancx J., Ovyn A., Eeckhout M., De Clercq P., De Smet S. (2018). Gut antimicrobial effects and nutritional value of black soldier fly (*Hermetia illucens* L.) prepupae for weaned piglets. Anim. Feed Sci. Technol., 235: 33–42.
- Sultana A., Luo H., Ramakrishna S. (2021). Harvesting of antimicrobial peptides from insect (*Hermetia illucens*) and its applications in the food packaging. Appl. Sci., 11: 6991.
- Szczepanik K., Furgal-Dierzuk I., Gala Ł., Świątkiewicz M. (2023). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin as feed additives on health and production indices in weaned pigs. Animals, 13: 163.
- Tang Q., Xu E., Wang Z., Xiao M., Cao S., Hu S., Wu Q., Xiong Y., Jiang Z., Wang F., Yang G., Wang L., Yi H. (2022). Dietary *Hermetia illucens* larvae meal improves growth performance and intestinal barrier function of weaned pigs under the environment of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. Front. Nutr., 8: 812011.
- Tonk M., Knorr E., Cabezas-Cruz A., Valdés J.J., Kollewe C., Vilcinskas A. (2015). *Tribolium castaneum* defensins are primarily

- active against Gram-positive bacteria. *J. Invertebr. Pathol.*, 132: 208–215.
- Van Moll L., De Smet J., Paas A., Tegtmeier D., Vilcinskas A., Cos P., Van Campenhout L. (2022). *In vitro* evaluation of antimicrobial peptides from the black soldier fly (*Hermetia illucens*) against a selection of human pathogens. *Microbiol. Spectr.*, 10: e01664–21.
- Vogel H., Müller A., Heckel D.G., Gutzeit H., Vilcinskas A. (2018). Nutritional immunology: diversification and diet-dependent expression of antimicrobial peptides in the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Dev. Comp. Immunol.*, 78: 141–148.
- Wang S., Zeng X., Yang Q., Qiao S. (2016). Antimicrobial peptides as potential alternatives to antibiotics in the food animal industry. *Int. J. Mol. Sci.*, 17: 603.
- Wang Y.S., Shelomi M. (2017). Review of black soldier fly (*Hermetia illucens*) as animal feed and human food. *Foods*, 6: 91.
- Waśko A., Bulak P., Polak-Berecka M., Nowak K., Polakowski C., Bieganowski A. (2016). The first report of the physicochemical structure of chitin isolated from *Hermetia illucens*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 92: 316–320.
- Wu Q., Patočka J., Kuča K. (2018). Insect antimicrobial peptides, a mini review. *Toxins*, 10: 461.
- Xia J., Ge C., Yao H. (2021). Antimicrobial peptides from black soldier fly (*Hermetia illucens*) as potential antimicrobial factors representing an alternative to antibiotics in livestock farming. *Animals*, 11: 1937.
- Xu J., Luo X., Fang G., Zhan S., Wu J., Wang D., Huang Y. (2020). Transgenic expression of antimicrobial peptides from black soldier fly enhance resistance against entomopathogenic bacteria in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 127: 103487.
- Yeaman M.R., Yount N.Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, 55: 27–55.
- Yu M., Li Z., Chen W., Rong T., Wang G., Ma X. (2019). *Hermetia illucens* larvae as a potential dietary protein source altered the microbiota and modulated mucosal immune status in the colon of finishing pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 10: 1–16.
- Zasloff M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84: 5449–5453.
- Zasloff M., Martin B., Chen H.C. (1988). Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85: 910–913.
- Zdybicka-Barabas A., Bulak P., Polakowski C., Bieganowski A., Waśko A., Cytryńska M. (2017). Immune response in the larvae of the black soldier fly *Hermetia illucens*. *Invertebr. Surviv. J.*, 14: 9–17.
- Zhang J., Li J., Peng Y., Gao X., Song Q., Zhang H., Elhag O., Cai M., Zheng L., Yu Z., Zhang J. (2022). Structural and functional characterizations and heterogenous expression of the antimicrobial peptides, Hidefensins, from black soldier fly, *Hermetia illucens* (L.). *Protein Expr. Purif.*, 192: 106032.
- Zhang L.J., Gallo R.L. (2016). Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.*, 26: R14–R19.
- Zhang Q.Y., Yan Z.B., Meng Y.M., Hong X.Y., Shao G., Ma J.J., Cheng X.R., Liu J., Kang J., Fu C.Y. (2021). Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential. *Mil. Med. Res.*, 8: 1–25.
- Żyłowska M., Wyszyńska A., Jaguszyn-Krynicka E.K. (2011). Antimicrobial peptides – defensins (in Polish). *Postępy Mikrobiol.*, 50: 223–234.

Received: 13 II 2023

Accepted: 30 V 2023

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Imię i nazwisko: **prof. dr hab. Małgorzata Świątkiewicz**

Aleksandrowice, 25.02.2025

Afiliacja: **Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa**

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy Szczepanik K., Świątkiewicz M. (2024). *Hermetia illucens* as a source of antimicrobial peptides – a review of in vitro and in vivo studies. Annals of Animal Science, 24(1), 77-88. <https://doi.org/10.2478/aoas-2023-0071>

mój udział polegał na: udział w opracowaniu koncepcji manuskryptu, pozyskanie finansowania, współtworzenie, korekta i edycja manuskryptu.



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Imię i nazwisko: **prof. dr hab. Małgorzata Świątkiewicz**

Aleksandrowice, 25.02.2025

Afiliacja: **Zakład Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa**

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy Szczepanik K., Furgał-Dierżuk I., Gala Ł., Świątkiewicz M. (2023). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin as feed additives on health and production indices in weaned pigs. Animals, 13(1), 163. <https://doi.org/10.3390/ani13010163>

mój udział polegał na: opracowanie koncepcji badań, pozyskanie finansowania i administracja projektem, udział w opracowaniu metodyki badań, udział w realizacji doświadczenia na zwierzętach, nadzór nad danymi i ich analizą, współtworzenie, korekta i edycja manuskryptu.



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Imię i nazwisko: **prof. dr hab. Małgorzata Świątkiewicz**

Aleksandrowice, 25.02.2025

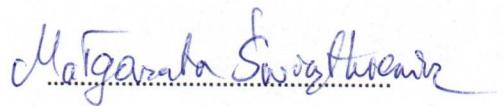
Afiliacja: **Zakład żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa**

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy Szczepanik K., Dobrowolski P., Świątkiewicz M. (2024). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin on intestinal histology and expression of tight junction proteins in weaned piglets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 108(6), 1820-1832. <https://doi.org/10.1111/jpn.14024>

mój udział polegał na: opracowanie koncepcji badań, pozyskanie finansowania i administracja projektem, udział w opracowaniu metodyki badań, udział w realizacji doświadczenia na zwierzętach, nadzór nad danymi i ich analizą, współtworzenie, korekta i edycja manuskryptu.



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Imię i nazwisko: **prof. dr hab. Małgorzata Świątkiewicz**

Aleksandrowice, 25.02.2025

Afiliacja: **Zakład żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa**

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy Szczepanik K., Oczkowicz M., Dobrowolski P., Świątkiewicz M. (2023). The protective effects of astaxanthin (AST) in the liver of weaned piglets. Animals, 13(20), 3268. <https://doi.org/10.3390/ani13203268>

mój udział polegał na: udział w opracowaniu koncepcji badań, pozyskanie finansowania i administracja projektem, udział w opracowaniu metodyki, udział w realizacji doświadczenia na zwierzętach, nadzór nad danymi i ich analizą, współtworzenie, korekta i edycja manuskryptu.



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Imię i nazwisko: **dr inż. Iwona Furgał-Dierżuk**

Aleksandrowice, 25.02.2025

Afiliacja: **Zakład żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa**

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy Szczepanik K., Furgał-Dierżuk I., Gala Ł., Świątkiewicz M. (2023). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin as feed additives on health and production indices in weaned pigs. Animals, 13(1), 163. <https://doi.org/10.3390/ani13010163>

mój udział polegał na: udział w opracowaniu metodyki badań krwi, wykonanie analiz krwi, analiza części danych.

Iwona Furgał-Dierżuk
(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Imię i nazwisko: **dr hab. Piotr Dobrowolski, prof. UMCS**

Aleksandrowice, 25.02.2025

Afiliacja: **Katedra Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii**

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy Szczepanik K., Dobrowolski P., Świątkiewicz M. (2024). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin on intestinal histology and expression of tight junction proteins in weaned piglets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 108(6), 1820-1832.
<https://doi.org/10.1111/jpn.14024>

mój udział polegał na: udział w opracowaniu metodyki badań, analiza i walidacja części danych, współtworzenie, korekta i edycja manuskryptu.



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORA

Imię i nazwisko: **dr hab. Piotr Dobrowolski, prof. UMCS**

Aleksandrowice, 25.02.2025

Afiliacja: **Katedra Anatomii Funkcjonalnej i Cytobiologii**

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy Szczepanik K., Oczkowicz M., Dobrowolski P., Świątkiewicz M. (2023). The protective effects of astaxanthin (AST) in the liver of weaned piglets. Animals, 13(20), 3268. <https://doi.org/10.3390/ani13203268>

mój udział polegał na: udział w opracowaniu metodyki, walidacja wyników, współtworzenie, korekta i edycja manuskryptu.



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Imię i nazwisko: **inż. Łukasz Gala**

Aleksandrowice, 25.02.2025

Afiliacja: **Zakład żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa**

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy Szczepanik K., Furgał-Dierżuk I., Gala Ł., Świątkiewicz M. (2023). Effects of *Hermetia illucens* larvae meal and astaxanthin as feed additives on health and production indices in weaned pigs. Animals, 13(1), 163. <https://doi.org/10.3390/ani13010163>

mój udział polegał na: udział w realizacji doświadczenia na zwierzętach, analiza części danych.



(czytelny podpis współautora)

OŚWIADCZENIE WSPÓŁAUTORA

Imię i nazwisko: **dr hab. Maria Oczkowicz, prof. IZ**

Aleksandrowice, 25.02.2025

Afiliacja: **Zakład Biologii Molekularnej Zwierząt**

Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy w Krakowie

Oświadczenie

Oświadczam, że w pracy Szczepanik K., Oczkowicz M., Dobrowolski P., Świątkiewicz M. (2023). The protective effects of astaxanthin (AST) in the liver of weaned piglets. Animals, 13(20), 3268. <https://doi.org/10.3390/ani13203268>

mój udział polegał na: udział w opracowaniu metodyki badań, analiza części danych i ich opracowanie, współtworzenie, korekta i edycja manuskryptu.



(czytelny podpis współautora)